

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**

**Dottorato di Ricerca in  
"Riproduzione, Sviluppo ed Accrescimento  
dell'Uomo"**

**Coordinatore: Prof. Claudio Pignata**



**Tesi di Dottorato**

***"Valutazione dell'efficacia e della sicurezza di nuovi  
approcci terapeutici in alcuni difetti congeniti del  
metabolismo"***

**Tutore  
Prof. Giancarlo Parenti**

**Candidata  
Dott.ssa Michelina Sibilio**

**Anno Accademico 2009/2010**

# INDICE

CAPITOLI	TITOLO	PAGINE
	<b>SOMMARIO</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE GENERALE</b>	<b>6</b>
	<b>1.1 Bibliografia</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b><i>PROGETTO 1.</i></b>	
	Valutazione dell'efficacia, della sicurezza e dei limiti della terapia enzimatica sostitutiva con $\alpha$ -L- iduronidasi ricombinante (rhIDUA) nella Mucopolisaccaridosi tipo I	<b>16</b>
	<b>2.1 INTRODUZIONE</b>	<b>17</b>
	<b>2.2 QUADRO CLINICO</b>	<b>19</b>
	<b>2.2.1</b> Sindrome di Hurler (MPS I-H)	<b>20</b>
	<b>2.2.2</b> Sindrome di Scheie (MPS I - S)	<b>25</b>
	<b>2.2.3</b> Sindrome di Hurler-Scheie (MPS I- H/S)	<b>26</b>
	<b>2.3 MPS I: CORRELAZIONE GENOTIPO- FENOTIPO</b>	<b>27</b>
	<b>2.4 DIAGNOSI</b>	<b>28</b>
	<b>2.5 TERAPIA</b>	<b>29</b>
	<b>2.5.1</b> Terapia di supporto	<b>29</b>
	<b>2.5.2</b> Trapianto di cellule staminali ematopoietiche	<b>30</b>
	<b>2.5.3</b> Terapia enzimatica sostitutiva	<b>34</b>
	<b>2.6 SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b>38</b>
	<b>2.7 PAZIENTI E METODI</b>	<b>39</b>
	<b>2.7.1</b> Pazienti	<b>39</b>
	<b>2.7.2</b> Metodi	<b>52</b>

<b>2.7.3</b>	Analisi mutazionale del gene IDUA	<b>53</b>
<b>2.7.4</b>	Programma di valutazione basale e di follow-up dei pazienti con MPS I	<b>54</b>
<b>2.8</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>60</b>
<b>2.9</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>77</b>
<b>2.10</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>83</b>
<b>2.11</b>	<b>APPENDICE DEL PROGETTO 1</b>	<b>87</b>
	<b>PROGETTO 2.</b>	

Valutazione dell'efficacia della terapia orale con tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), nel ridurre i livelli plasmatici di fenilalanina in tutti i pazienti con iperfenilalaninemia (HPA) e valutazione della tollerabilità e della sicurezza del trattamento con BH<sub>4</sub> a lungo termine. **110**

*Studio Finanziato dalla Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) - Protocollo FARM5MATC7*

<b>3.1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>111</b>
<b>3.2</b>	<b>QUADRO CLINICO</b>	<b>118</b>
<b>3.3</b>	<b>PATOGENESI</b>	<b>119</b>
<b>3.4</b>	<b>ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE PAH</b>	<b>122</b>
<b>3.5</b>	<b>DIAGNOSI</b>	<b>125</b>
<b>3.6</b>	<b>TERAPIA DIETETICA</b>	<b>127</b>
<b>3.7</b>	<b>APPROCCI TERAPEUTICI ALTERNATIVI</b>	<b>129</b>
<b>3.8</b>	<b>LA TETRAIDROBIOPTERINA (BH<sub>4</sub>)</b>	<b>132</b>
<b>3.9</b>	<b>SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b>138</b>
<b>3.10</b>	<b>PAZIENTI E METODI</b>	<b>139</b>
<b>3.10.1</b>	Analisi del fenotipo biochimico	<b>141</b>
<b>3.10.2</b>	Analisi mutazionale del gene PAH e delle frequenze genotipiche	<b>142</b>
<b>3.10.3</b>	Valutazione della BH <sub>4</sub> -responsività	<b>143</b>

	<b>3.10.4</b>	Terapia a lungo termine con BH <sub>4</sub>	<b>145</b>
	<b>3.11</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>146</b>
	<b>3.11.1</b>	Fenotipo biochimico	<b>146</b>
	<b>3.11.2</b>	Genotipo	<b>150</b>
	<b>3.11.3</b>	Risultati dei test da carico con BH <sub>4</sub> per la valutazione della BH <sub>4</sub> -responsività	<b>154</b>
	<b>3.11.4</b>	Risultati della terapia a lungo termine con BH <sub>4</sub>	<b>171</b>
	<b>3.12</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>173</b>
	<b>3.13</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>179</b>
	<b>3.14</b>	<b><i>APPENDICE DEL PROGETTO 2</i></b>	<b>187</b>
<b>4</b>	<b>4.1</b>	Pubblicazioni effettuate dalla Dr. Michelina Sibilio, durante il periodo di dottorato	<b>200</b>
	<b>4.2</b>	Elenco delle pubblicazioni	<b>201</b>



## SOMMARIO

Negli ultimi anni grandi progressi sono stati effettuati per il trattamento di alcuni errori congeniti del metabolismo, al fine di migliorare la qualità di vita, la crescita e lo sviluppo dei pazienti affetti. Da sempre il trattamento delle LSD rappresenta una grande sfida per i medici coinvolti nel management dei pazienti affetti da tali patologie. In passato l'unica terapia possibile per le LSD era una terapia di supporto, mirata a combattere le complicanze associate alle LSD. Al contrario non era disponibile alcun approccio mirato alla correzione del difetto di base della malattia. Negli ultimi 20 anni, le maggiori conoscenze sulle basi molecolari e biochimiche di varie malattie da accumulo lisosomiale, e la disponibilità di nuove tecnologie hanno reso possibile l'introduzione e la sperimentazione, con risultati anche molto incoraggianti, di diverse strategie terapeutiche innovative quali la terapia enzimatica sostitutiva (*Enzyme Replacement Therapy*, ERT). Oltre alle malattie d'accumulo lisosomali, nuove strategie terapeutiche sono state sperimentate anche in altri errori congeniti del metabolismo, quali le aminoacidopatie, in particolare nelle iperfenilalaninemie. Storicamente, il trattamento della HPA è stato unicamente non-farmacologico e i pazienti affetti dovevano essere trattati con una dieta a ridotto contenuto di Phe entro le prime settimane di vita. È attualmente noto che il trattamento deve essere necessariamente continuato per tutta la vita. Sfortunatamente, la compliance alla terapia dietetica risulta essere sub-ottimale, e molti pazienti, in particolare gli adolescenti, non seguono o sospendono lo schema dietetico prescritto. Lo studio qui riportato è il risultato di quattro anni di ricerca effettuato nell'ambito del programma del Dottorato, sviluppato presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università "Federico II" di Napoli da Novembre 2006 ad Ottobre 2010. Tale studio ha permesso la realizzazione di due progetti, incentrati su nuovi approcci terapeutici in due errori congeniti del metabolismo: la Mucopolisaccaridosi tipo I (MPS I) e le iperfenilalaninemia (HPA).

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE GENERALE

Negli ultimi anni grandi progressi sono stati effettuati per il trattamento di alcuni errori congeniti del metabolismo, al fine di migliorare la qualità di vita, la crescita e lo sviluppo dei pazienti affetti.

Per le malattie da accumulo lisosomiale (LSD), le maggiori conoscenze sulla fisiopatologia dei lisosomi e sui meccanismi coinvolti nel targeting degli enzimi lisosomiali, hanno costituito il presupposto per l'introduzione e la sperimentazione, con risultati anche molto incoraggianti, di diverse strategie terapeutiche innovative.

I lisosomi sono organelli subcellulari, limitati da membrana, che contengono enzimi idrolitici responsabili della degradazione di macromolecole. Nei lisosomi sono contenuti oltre cinquanta enzimi idrolitici, che comprendono proteasi, nucleasi, glicosidasi, lipasi, fosforilasi, fosfatasi e solfatasi. Tutti questi enzimi per poter svolgere in maniera ottimale la loro attività necessitano di un ambiente acido. Gli enzimi lisosomiali, sono sintetizzati nel reticolo endoplasmico e sono trasportati verso i lisosomi attraverso un complesso itinerario che comprende l'apparato di Golgi, il network trans-Golgi, e i late endosomes, che maturando danno origine al lisosoma. In questo itinerario, gli enzimi lisosomiali vengono riconosciuti e guidati in modo specifico grazie alla presenza di un marcatore unico che è il mannosio-6-fosfato (M6P). Il M6P viene aggiunto in maniera specifica agli oligosaccaridi N-linked degli enzimi lisosomiali, nel momento in cui attraversano il lume del cis-Golgi. Gli enzimi lisosomiali che possiedono il M6P, si legano al recettore del M6P (MPR) nell'apparato di Golgi, e trasportati ai lisosomi. Un concetto fondamentale è che il MPR è presente anche sulla membrana plasmatica delle cellule, dove è in grado di captare e

internalizzare eventuali enzimi lisosomiali in circolo, endogeni o esogeni (Grabowski GA, 2008). Grazie all'identificazione del mannosio-6-fosfato (M6P) come residuo indispensabile per il targeting lisosomiale, si è potuto dimostrare che i residui di M6P presenti sulle catene oligosaccaridiche degli enzimi lisosomiali esogeni rendono possibile il legame specifico dell'enzima ai recettori dell'M6P presenti sulla superficie cellulare, cui segue l'internalizzazione dell'enzima nella cellula prima, e successivamente nei lisosomi, dove esercita la sua attività catalitica.

Al momento sono note circa cinquanta malattie lisomiali d'accumulo (LSD), che, come gruppo, hanno una frequenza stimabile in 1/8000 nati vivi, ma sono rare o molto rare se considerate singolarmente (Meikle et al., 1999). Come descritto precedentemente, molte sono le tappe necessarie per ottenere una sintesi e una corretta maturazione delle idrolasi lisomiali. Pertanto, le malattie lisomiali possono essere causate da difetti genetici che interessano la sintesi o la maturazione delle idrolasi lisomiali. Il deficit di uno specifico enzima lisosomiale, determina l'accumulo intracellulare di una varietà di substrati non degradati, che comprendono per esempio glicosaminoglicani, glicogeno e sfingolipidi. Le LSD sono un gruppo di malattie multisistemiche, caratterizzate principalmente da dismorfismi facciali e scheletrici, da visceromegalia, da segni ematologici, da alterazioni oculari, con possibile coinvolgimento del sistema nervoso centrale e del cuore. I quadri clinici delle LSD sono caratterizzate da una estrema variabilità, sia per la l'età di esordio dei sintomi e sia per la severità del decorso clinico. Nella maggior parte dei casi le LSD sono caratterizzate da un decorso progressivo, gravemente disabilitante o letale, che può causare handicap severo nei pazienti, con conseguente carico sociale significativo.

Da sempre il trattamento delle LSD rappresenta una grande sfida per i medici coinvolti nel management dei pazienti affetti da tali patologie. In passato l'unica terapia possibile per le LSD era una terapia di supporto, mirata a combattere le complicanze associate alle LSD. Al contrario non era disponibile alcun approccio mirato alla correzione del difetto di base della

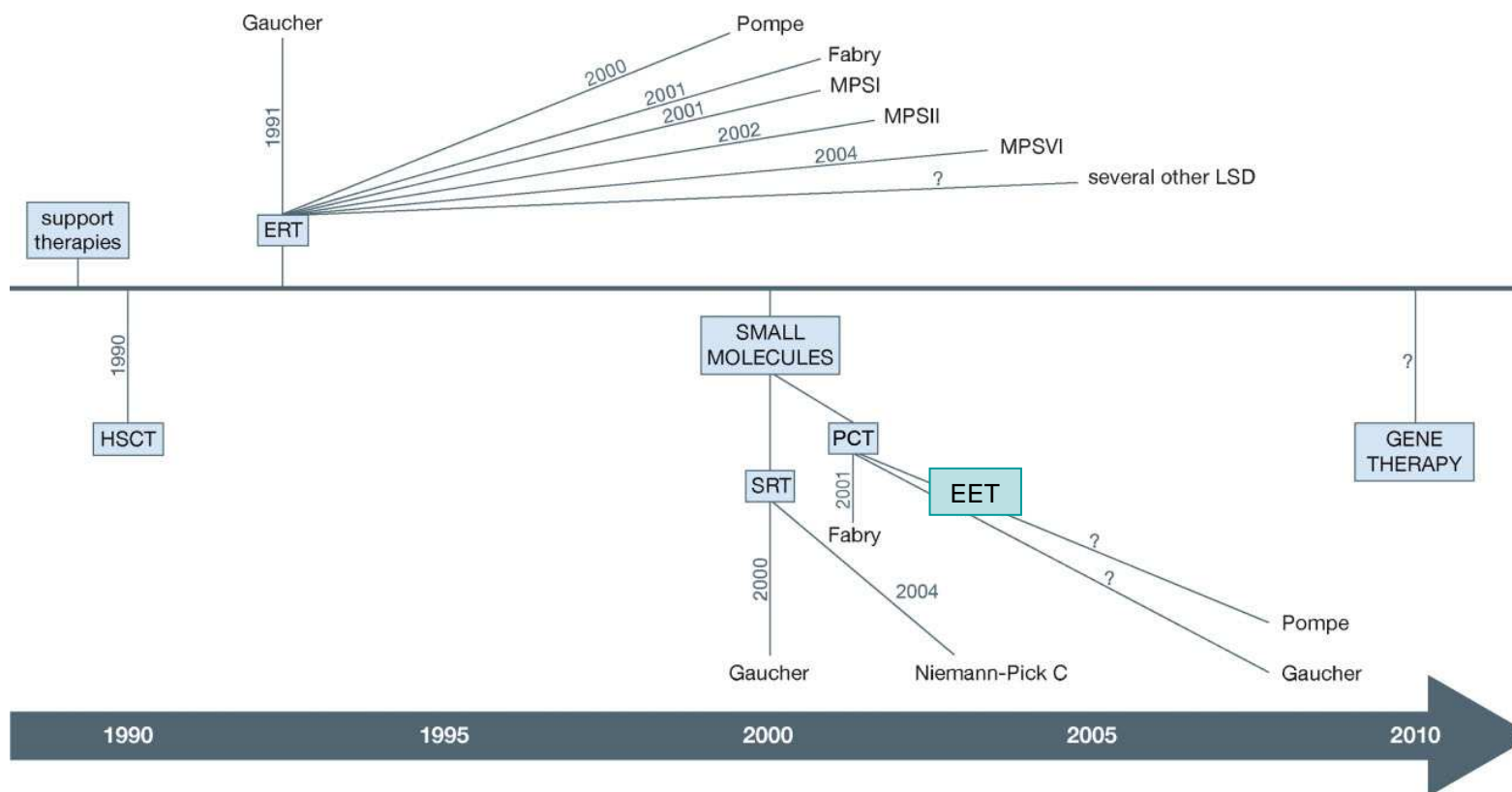
malattia. Negli ultimi 20 anni, le maggiori conoscenze sulle basi molecolari e biochimiche di varie malattie da accumulo lisosomiale, e la disponibilità di nuove tecnologie hanno reso possibile l'introduzione e la sperimentazione, con risultati anche molto incoraggianti, di diverse strategie terapeutiche innovative (Desnick RJ, 2004; Platt FM et al., 2008; Grabowski GA, 2008; Parenti G, 2009), quali la terapia enzimatica sostitutiva (*Enzyme Replacement Therapy*, ERT), il trapianto di midollo osseo o il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (*Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, HSCT), la “terapia di riduzione del substrato (*Substrate Reduction Therapy*, SRT)” e infine “la stimolazione dell'attività enzimatica residua endogena mediante l'uso di farmaci chaperone (*Enzyme Enhancement Therapy*, EET)” (**Figura 1**). In particolare, le conoscenze sui meccanismi coinvolti nel targeting degli enzimi lisosomiali, hanno costituito il presupposto per le ricerche sull'impiego della ERT nelle LSD.

Il razionale di questo approccio è basato sul fatto che gli enzimi lisosomiali vengono indirizzati ai lisosomi, dove devono esplicare la loro funzione, mediante un sistema di ligandi (il mannosio 6-fosfato e il mannosio, esposti sulle catene oligosaccaridiche delle idrolasi lisosomiali) e di recettori (i recettori del mannosio 6-fosfato e del mannosio). Grazie a questo meccanismo ed al fatto che i recettori sono presenti anche sulla membrana plasmatica delle cellule, è stato dimostrato che un enzima dato dall'esterno, per infusione venosa, viene captato dalle cellule e arriva a destinazione nei lisosomi, dove è in grado di correggere il difetto enzimatico e in tal modo rimuovere il materiale accumulato. Tali conoscenze hanno così consentito l'introduzione della ERT per il trattamento delle LSD.

Studi successivi, hanno dimostrato che oltre al meccanismo mediato dal recettore del M6P, esistono altri *pathway* attraverso cui le proteine raggiungono i lisosomi.

La prima malattia d'accumulo ad essere trattata con successo con la ERT è stata la malattia di Gaucher. Successivamente, questo nuovo approccio terapeutico è stato preso in considerazione anche per il trattamento di altre

malattie d'accumulo, quali la malattia di Fabry, la malattia di Pompe, e la Mucopolisaccaridosi tipo I, II e VI.



**Figura 1**

**Approcci terapeutici per LSD.**

*Fino alla fine degli anni '80, l'unica terapia disponibile per il trattamento delle LSD era una terapia di supporto. Negli ultimi 20 anni, nuovi approcci terapeutici sono stati introdotti, quali l'HSCT, ERT, EET e la SRT. Ognuna di queste strategie terapeutiche è stata utilizzata in differenti malattie. Per ciascun approccio terapeutico, è stato riportato l'anno in cui veniva per la prima volta utilizzato clinicamente. (Figura ripresa da Parenti G; 2009).*

Oltre alle malattie d'accumulo lisosmali, nuove strategie terapeutiche sono state sperimentate anche in altri errori congeniti del metabolismo, quali le aminoacidopatie, in particolare nelle iperfenilalaninemie. L'iperfenilalaninemia (HPA; MIM 261600) è un errore congenito del metabolismo, a carico del metabolismo dell'aminoacido fenilalanina (Phe), ereditato con modalità autosomica recessiva, causata dal deficit dell'enzima epatico fenilalanina idrossilasi (PAH). La Phe è un aminoacido essenziale fondamentale per la sintesi proteica. Il ruolo principale della PAH è trasformare la Phe, insieme al cofattore 6R-tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) in tirosina. L'assenza o la ridotta funzionalità della PAH, determina un accumulo di Phe, che successivamente viene poi metabolizzata in fenilpiruvato e/o fenilacetato (fenilchetoni), che sono escreti con le urine. Il quadro clinico di pazienti HPA-non trattati è caratterizzato da encefalopatia progressiva con microcefalia, ritardo mentale, epilessie e altre anomalie del comportamento. Storicamente, il trattamento della HPA è stato unicamente non-farmacologico e i pazienti affetti dovevano essere trattati con una dieta a ridotto contenuto di Phe entro le prime settimane di vita. È attualmente noto che il trattamento deve essere necessariamente continuato per tutta la vita (Scriver C.R. et al., 2001). Sfortunatamente, la compliance alla terapia dietetica risulta essere sub-ottimale, e molti pazienti, in particolare gli adolescenti, non seguono o sospendono lo schema dietetico prescritto (Koch R et al., 2002). Un cattivo controllo metabolico dei livelli di Phe è stato associato ad anomalie neuroradiologiche, evidenziate mediante la risonanza magnetica, sia nei bambini che negli adulti, e a valori significativamente più bassi del quoziente intellettivo, dell'attenzione e del tempo di reazione (National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement, 2001). Inoltre, elevati livelli di Phe sono stati associati ad aumentato rischio per disfunzione cognitiva, ad alterazioni del comportamento e a problemi del visus. Pertanto, il tempestivo inizio del trattamento dietetico è fondamentale per ridurre e/o eliminare il rischio di tali complicanze. Per migliorare l'outcome clinico e la compliance dei

pazienti, la ricerca ha focalizzato il proprio obiettivo sullo sviluppo di nuovi approcci terapeutici di tipo farmacologici per il trattamento della HPA.

Nel 1999, Kure et al., dimostrarono che la somministrazione orale di  $BH_4$  era in grado di ridurre le concentrazioni plasmatiche di Phe in pazienti affetti da PKU; successivamente ulteriori studi hanno confermato la sicurezza e l'efficacia di questo farmaco. Sulla base di tali esperienze, a dicembre del 2007, la "Food and Drug Administration" (FDA) ha approvato il farmaco orfano "sapropterina dicloridrato" una formulazione sintetica dell'isomero attivo della tetraidrobioptrina, nota con il nome di KUVAN (Kuvan®, BioMarin Corporation, Tiburon, CA) per il trattamento di un sottogruppo di pazienti affetti da iperfenilalaninemia, offrendo in tal modo una nuova e promettente opzione terapeutica per il management di questi pazienti. A dicembre del 2008, anche in Europa il Kuvan è stato autorizzato per l'immissione in commercio e dal 15 Settembre 2009, il Kuvan è ufficialmente disponibile anche in Italia. In Italia, Kuvan è l'unico farmaco approvato per il trattamento della HPA. La sapropterina dicloridrato è indicata per ridurre i livelli di fenilalanina plasmatica in pazienti responsivi alla  $BH_4$ . Attualmente, i dati sulla sicurezza e l'efficacia a lungo termine della sapropterina dicloridrato sono ancora limitati; pertanto ulteriori studi sono necessari per meglio definire alcuni aspetti ancora non chiari.

Lo studio qui riportato è il risultato di quattro anni di ricerca effettuato nell'ambito del programma del Dottorato, sviluppato presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università "Federico II" di Napoli da Novembre 2006 ad Ottobre 2010. Tale studio ha permesso la realizzazione di due progetti, incentrati su nuovi approcci terapeutici in alcuni errori congeniti del metabolismo. Il primo progetto è focalizzato sulla caratterizzazione clinica e molecolare di tutti i pazienti con Mucopolisaccaridosi tipo I (MPS I), una malattia d'accumulo lisosomiale, seguiti presso il Dipartimento di Pediatria e il Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università "Federico II" di Napoli e sulla valutazione a lungo termine dell'efficacia e della sicurezza della Terapia Enzimatica Sostitutiva (ERT) con enzima



ricombinante alfa-L-iduronidasi (rhIDUA) nella MPS I. Nell'ambito del secondo studio, il nostro obiettivo è stato tipizzare, sotto il profilo genetico, i pazienti seguiti presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università Federico II di Napoli, affetti da iperfenilalaninemia (HPA); sottoporre questi pazienti a carico orale con la tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) per testarne la eventuale responsività; mettere in correlazione l'eventuale risposta al carico orale con BH<sub>4</sub> al pattern genotipico e verificare la sicurezza a lungo termine del trattamento con BH<sub>4</sub>.

## 1.1 BIBLIOGRAFIA

Desnick RJ. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2004;27(3):385-410. Review.

Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Jul;5(7):554-65. Review.

Grabowski GA. Treatment perspectives for the lysosomal storage diseases. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2008 Mar;13(1):197-211. Review.

Koch R, Burton B, Hoganson G, Peterson R, Rhead W, Rouse B, et al. Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *J Inherit Metab Dis*. 2002 Sep;25(5):333-46.

Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y, Narisawa K. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr*. 1999 Sep;135(3):375-8.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*. 1999 Jan 20;281(3):249-54.

National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Phenylketonuria: screening and management, October 16-18, 2000. *Pediatrics* 2001; 108; 972-982

Parenti G. Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol Med*. 2009 Aug;1(5):268-79. Review.

Platt FM, Jeyakumar M. Substrate reduction therapy. *Acta Paediatr Suppl*. 2008 Apr;97(457):88-93. Review.

Scriver C.R., Kaufman S., Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency, In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.); B. Childs, K.W. Kinzler, B. Vogelstein (Assoc. eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8<sup>th</sup> Edition. Vol. 2, New York: McGraw-Hill, 2001:1667–1724.

## **CAPITOLO 2**

# **PROGETTO 1: VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA, DELLA SICUREZZA E DEI LIMITI DELLA TERAPIA ENZIMATICA SOSTITUTIVA CON $\alpha$ -L- IDURONIDASI RICOMBINANTE (rhIDUA) NELLA MUCOPOLISACCARIDOSI TIPO I**

## 2.1 INTRODUZIONE

La mucopolisaccaridosi tipo I (MPS I) è la forma di mucopolisaccaridosi più frequente. Ha un'incidenza di 1:100000 nati vivi ed è causata dal deficit dell'enzima lisosomiale  $\alpha$ -L-iduronidasi (IDUA). L'IDUA è un enzima coinvolto nel catabolismo dei glicosaminoglicani (GAG) dermatansolfato ed eparansolfato; entrambi questi glicosaminoglicani sono dei polisaccaridi complessi e costituiscono uno dei componenti principali della matrice extracellulare. Il deficit di IDUA determina l'accumulo progressivo di dermatansolfato ed eparansolfato nei lisosomi in tutto l', con conseguente danno d'organo, tissutale e cellulare. Storicamente la MPS I è stata suddivisa in 3 diverse forme cliniche a decrescente gravità: la sindrome di Hurler (forma severa) con sopravvivenza < 10 anni, la sindrome di Hurler-Scheie (forma intermedia) con sopravvivenza < 25 anni e la sindrome di Scheie (forma attenuata) con una durata di vita normale ma comunque associata a gravi disabilità. Oggi invece appare appropriato considerare la MPS I come una malattia eterogenea con un ampio spettro di espressione fenotipica, che va dalla forma grave (sindrome di Hurler) a quella più attenuata (sindrome di Scheie), indistinguibili dal punto di vista biochimico (**Figura 1**). Attualmente, in seguito al difficile inquadramento di diversi pazienti per l'ampia variabilità dell'espressione clinica, è raccomandata la classificazione della MPS I in una "forma grave" ad esordio precoce ed associata a grave ritardo psicomotorio ed una "forma attenuata", ad esordio più tardivo, in cui il ritardo psicomotorio è lieve o del tutto assente.



**Figura 1**

**Eterogeneità fenotipica nella MPS I**

*La classificazione della MPS I in tre fenotipi clinici distinti è in parte arbitraria, in quanto lo spettro delle manifestazioni cliniche rappresenta piuttosto un “continuum” dalla forma più grave (immagine di destra) a quella più attenuata (immagine di sinistra).*

## 2.2 QUADRO CLINICO

Il quadro clinico e il decorso della MPS I sono altamente eterogenei e consistono in un coinvolgimento multisistemico progressivo che comprende l'apparato respiratorio, cardiaco, scheletrico, oculare e in alcuni casi anche il sistema nervoso centrale. La ampia eterogeneità della malattia sembra essere legata principalmente al grande numero di differenti mutazioni nel gene IDUA che codifica per l' $\alpha$ -L-iduronidasi. In questo lavoro, per la descrizione del quadro clinico abbiamo preferito mantenere ancora la descrizione dei 3 fenotipi storicamente descritti per la MPS I.

### ***2.2.1 Sindrome di Hurler (MPS I-H)***

E' la forma più grave e progressiva di MPS I (OMIM 607014), coinvolge molti organi e tessuti e conduce a morte precoce, generalmente entro i primi dieci anni di vita. Alla nascita il neonato con S. di Hurler è apparentemente normale e generalmente la diagnosi viene effettuata fra i 6 e i 24 mesi (**Figura 2**). E' suggestiva la combinazione di deformità scheletriche (**Figura 3**), fronte prominente, tratti del volto grossolani, bassa statura, evidenza di un gibbo insorto precocemente a livello lombare , ernie inguinali ed ombelicali (**Figura 4**), ricorrenti infezioni respiratorie e nasali, opacità corneale (**Figura 5**), rigidità muscolare e articolare (**Figura 6**), epatosplenomegalia e macroglossia (Neufeld EF et al., 2001). Nei bambini sotto l'anno di età può essere caratteristica l'insorgenza di una miocardiopatia acuta, con conferma autoptica di fibroelastosi endocardica (Stephan MJ et al., 1989).

Le manifestazioni precoci della S. di Hurler possono essere subdole o aspecifiche e talvolta l'insufficienza cardiaca può precedere il riconoscimento del disordine. Nel corso della malattia può svilupparsi precocemente una compromissione grave e generalizzata delle arterie coronariche. I pazienti con MPS I-H possono presentare crescita eccessiva nei primi mesi di vita, ma vi è poi una decelerazione della crescita tra i 6 e i 18 mesi, con un'altezza massima riportata di 110 centimetri. La maggior parte dei pazienti, a causa del ritardo mentale, della sordità cronica e della macroglossia sviluppa delle limitate capacità verbali. Un certo grado di ipoacusia è probabilmente riscontrabile in tutti i pazienti, legata di solito alla combinazione di problemi di conduzione e neurosensoriali. La maggior parte di questi bambini manifesta respirazione rumorosa, secrezione nasale persistente, infezioni frequenti delle vie aeree superiori ed otiti. Pertanto i pazienti con MPS I dovrebbero ricevere controlli ORL ed audiologici almeno una volta l'anno. La malattia respiratoria ha in genere una componente sia restrittiva che ostruttiva. La restrizione deriva dall'accumulo di GAG nelle lamine pleuriche, da una cassa toracica piccola, dalla rigidità delle articolazioni e dalla ridotta escursione diaframmatica dovuta alla epatosplenomegalia. L'ostruzione è secondaria alla presenza di dense secrezioni e all'accumulo di GAG all'interno delle vie aeree. La lingua, i tessuti linfoidi e i tessuti



molli della faringe si espandono a causa dell'accumulo di GAG con conseguente progressivo restringimento del lume. I conseguenti problemi respiratori con sintomi quali infezioni frequenti, insufficienza respiratoria, e grave apnea notturna rendono necessario l'impiego della pressione positiva continua delle vie aeree (CPAP) o la tracheotomia (Peters ME et al., 1985; Shapiro J et al., 1985; Myer CMD, 1991). Il coinvolgimento del sistema nervoso centrale (SNC) è la conseguenza dell'accumulo dei GAG nei neuroni, nei macrofagi e nelle meningi e si ritiene peggiori a causa di fattori secondari quali apnea notturna ed ipossia. Una complicanza molto frequente nei pazienti affetti da forma severa di MPS I è l'*idrocefalo comunicante*, causato dall'ispessimento delle leptomeningi secondario all'accumulo di GAG. Il posizionamento di shunt ventricolo-peritoneale può migliorare alcuni dei sintomi correlati all'idrocefalo, come ad esempio la cefalea e le alterazioni del ritmo sonno-veglia. Nell'ambito del sistema nervoso periferico si riscontra spesso la *sindrome del tunnel carpale* che può anche non manifestare i classici sintomi precoci quali parestesia e dolore. E' frequente il riscontro di *opacità corneale*, *glaucoma*, *degenerazione retinica* e *danni a carico del nervo ottico*. Clinicamente e radiologicamente nella S. di Hurler, si osservano alterazioni scheletriche tipiche delle MPS che vanno sotto il nome di disostosi multipla, causate da un alterato rimodellamento strutturale delle ossa in crescita (**Figura 3**). Tali alterazioni sono: cranio largo con ispessimento della calotta, orbite poco profonde, chiusura precoce delle suture lambdoidea e sagittale, sella turcica a forma di "J", denti molto distanti tra loro e presenza di cisti odontogene. Precocemente può osservarsi ipoplasia anteriore delle vertebre lombari e conseguente cifosi; le diafisi delle ossa lunghe sono ingrossate con metafisi di aspetto irregolare con nuclei epifisari ben sviluppati. Solitamente il bacino è ipoplasico con teste femorali piccole e coxa valga; le clavicole sono ispessite, corte ed irregolari. Le coste hanno un aspetto slargato (a "spatola"): ristrette in vicinanza delle vertebre, appiattite e larghe nell'estremità sternale; le falangi appaiono corte e trapezoidali, con diafisi allargate. Nell'ambito delle manifestazioni cliniche della disostosi multipla, la displasia odontoidea è ritenuta la componente maggiormente rappresentata nella Sindrome di Hurler, come conseguenza di tale anomalia, sussiste un aumentato rischio di sublussazione

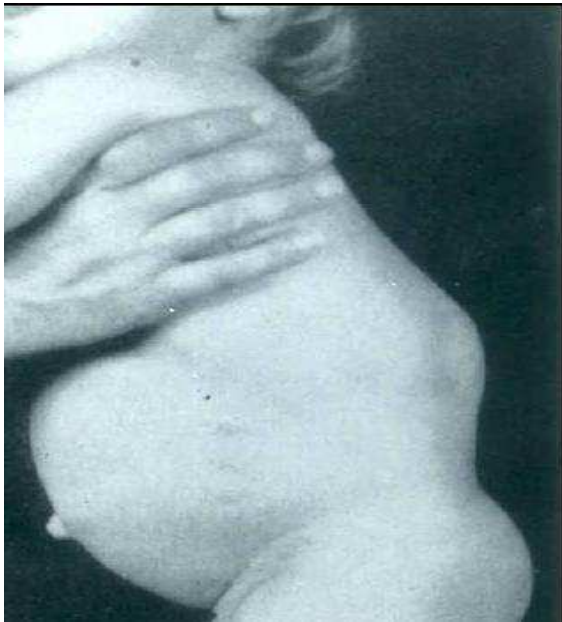
atlantoassiale, con potenziale danno al midollo con conseguenti severe alterazioni funzionali che in casi selezionati possono richiedere interventi mirati di decompressione (Neufeld EF et al., 2001). Tutti i pazienti con MPS I dovrebbero eseguire periodica valutazione radiologica, ortopedica e fisiatrica (almeno ogni 2 anni) per valutare la progressione delle alterazioni scheletriche, il grado di restrizione articolare ed attuare tempestivamente gli interventi atti a sostenere ove possibile la funzione motoria e il tono muscolare.



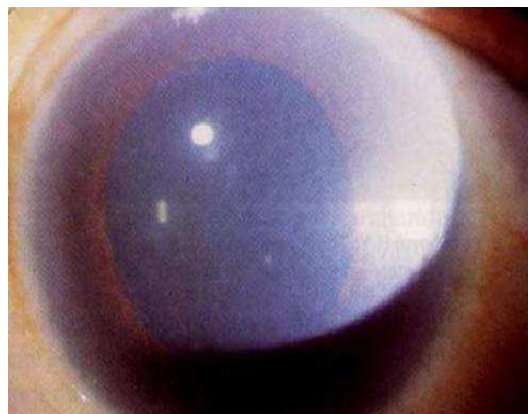
**Figura 2 -** Progressione della malattia nella MPS I - Hurler



**Figura 3 -** Anomalie scheletriche nella MPS I



**Figura 4 -** Ernia ombelicale e gibbo in pz con MPS I



**Figura 5 -** Opacità corneale



**Figura 6 -** Limitazione articolare

### ***2.2.2 Sindrome di Scheie (MPS I - S)***

E' la forma attenuata di MPS I (OMIM 607016), ed è caratterizzata da valvulopatia aortica, rigidità articolare, opacità corneali e alterazioni somatiche. La sintomatologia più significativa si manifesta dopo i 5 anni e la diagnosi si pone tra i 10 e 20 anni. Nei pazienti con Sindrome di Scheie generalmente lo sviluppo psicomotorio e la statura sono normali ma sono presenti importanti alterazioni articolari e oculari come grave opacità corneale, glaucoma e degenerazione retinica. La valvulopatia aortica è frequente tanto da rendere talvolta necessaria la sostituzione della valvola. In alcuni pazienti si manifesta un'ostruzione delle vie aeree che causa apnee notturne, rendendo necessaria la tracheotomia (Neufeld EF et al., 2001).

### ***2.2.3 Sindrome di Hurler-Scheie (MPS I- H/S)***

Con questo termine viene descritto un fenotipo clinico intermedio tra la S. di Hurler e quella di Scheie (OMIM 607015), caratteristico è il progressivo coinvolgimento somatico che include la disostosi multipla, mentre il coinvolgimento del sistema nervoso centrale è generalmente assente o di lieve entità. La patologia scheletrica può rappresentare l'elemento predominante nella MPS I attenuata e può variare da forme gravi a forme lievi. I pazienti, generalmente di bassa statura, soffrono di progressive ed ingravescenti limitazioni articolari che limitano le capacità motorie dei soggetti fino alla completa impotenza funzionale.

La sintomatologia si manifesta fra i 3 e gli 8 anni; la sopravvivenza giunge abitualmente fino all'età adulta e le principali cause di morte sono costituite dal coinvolgimento cardiaco e dall'ostruzione delle vie aeree superiori (Neufeld EF et al., 2001). Fisioterapia ed idroterapia sono utili per alleviare il dolore da rigidità articolare. A volte è raccomandabile l'applicazione di tutori per mantenere corretta la posizione dell'articolazione e prevenire deformità flessorie stabili. Consigliabile il controllo ortopedico almeno ogni anno. Utili sono i controlli radiografici e fisiatrici per misurare lo stato di progressione della rigidità scheletrica e per intervenire al fine di mantenere la mobilità articolare e la forza muscolare.

## **2.3 MPS I: CORRELAZIONE GENOTIPO - FENOTIPO**

Il gene che codifica l'IDUA è localizzato sul cromosoma 4 (4p16.3) e comprende 14 esoni (Scott HS et al., 1990; Scott HS et al., 1992). L'analisi molecolare del gene IDUA in pazienti con MPS I ha consentito di identificare le mutazioni responsabili della malattia, anche se bisogna tenere presente che la correlazione genotipo-fenotipo è in questa patologia molto complessa da definire. È stato ipotizzato che l'ampia variabilità fenotipica della MPS I sia legata in parte al gran numero di mutazioni a carico del gene IDUA. Ad oggi, più di 100 mutazioni, che comprendono mutazioni missense, non-sense, delezioni, inserzioni, mutazioni nei siti di splicing, sono state identificate lungo tutto il gene IDUA, ma molte di queste essendo poco frequenti non sono utili a fini prognostici. Allo stato attuale delle conoscenze ha sicuramente valore predittivo per il fenotipo severo la presenza di mutazioni non-senso, quale ad esempio la Q70X e W402X su entrambe gli alleli del gene IDUA. Altre mutazioni (474-2a-g, A327P, P533R, A75T, L218P) sono molto meno frequenti, ma esprimono comunque un fenotipo Hurler; tra queste P533R ha avuto un riscontro relativamente frequente in Sicilia (Gatti R et al., 1997).

## 2.4 DIAGNOSI

La valutazione dell'escrezione urinaria dei glicosaminoglicani è stato il primo strumento analitico disponibile per la diagnosi delle mucopolisaccaridosi e mantiene ancora oggi un suo ruolo come esame di primo livello. Sono disponibili molti metodi per la ricerca dei GAG urinari, dai test rapidi semiquantitativi a quelli, più precisi, qualitativi e quantitativi. Quando si sospetta che un paziente sia affetto da una MPS I (sulla base delle manifestazioni cliniche, dei riscontri radiologici o dei test urinari di screening) la conferma della diagnosi è data dalla determinazione dell'attività dell'  $\alpha$ -L-iduronidasi eseguibile su siero, leucociti o sui fibroblasti coltivati (Hall CW et al., 1978). L'entità dell'attività enzimatica residua misurata in vitro da estratti cellulari non correla con il grado di severità del fenotipo. Sembra che sia sufficiente meno dello 0,1% della normale proteina IDUA per dar luogo ad un fenotipo lieve, sebbene ciò debba essere confermato da test più rigorosi. La diagnosi prenatale è possibile, attraverso la determinazione dell'attività enzimatica nei villi coriali (tra 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> settimana di gestazione) o negli amniociti (tra 16<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> settimana di gestazione). Una diagnosi precoce può essere importante per una gestione ottimale della MPS I. La giustificazione di un programma di screening neonatale è, oggi, diventata più concreta a seguito della realizzazione di notevoli progressi nel trattamento di queste malattie (ERT e trapianto di cellule staminali del sistema ematopoietico).



## 2.5 TERAPIA

Si è cercato, negli anni, di affrontare con varie strategie terapeutiche i numerosi aspetti del quadro clinico della mucopolisaccaridosi I. Ancora oggi un ruolo importante nella gestione di tali pazienti è svolto dalla terapia di supporto, cui si sono aggiunte nuove proposte terapeutiche quali il trapianto di midollo e, negli ultimi nove anni, la terapia enzimatica sostitutiva (ERT). Tali terapie, volte a correggere il deficit enzimatico di base, hanno condizionato positivamente la prognosi e la qualità di vita dei pazienti.

### ***2.5.1 Terapia di supporto***

La storia naturale della MPS I, caratterizzata dal progressivo coinvolgimento degli organi, impone la necessità di una costante valutazione delle condizioni cliniche per il trattamento delle complicanze connesse a tale patologia. Questo approccio terapeutico di “supporto”, pur non potendo influire sul disordine metabolico di base, mira a migliorare la qualità di vita. E’ importante, per esempio, sottoporre periodicamente il paziente a visita cardiologica con indagine ecocardiografica per rilevare la presenza di una eventuale valvulopatia e/o insufficienza cardiaca congestizia e poter porre in atto gli opportuni presidi medico-chirurgici. Per ciò che concerne i principali problemi respiratori (asma, apnea ostruttiva notturna, depositi tracheali) è possibile effettuarne la caratterizzazione mediante indagini specifiche, quali polisonnografia e test di funzionalità polmonare. Si possono somministrare, se necessario, farmaci anti-asmatici; in alcuni casi la CPAP nasale è ritenuta valido rimedio contro le apnee notturne (Neufeld EF et al., 2001; Wraith JE, 1995; Nicolson SC, et al., 1992).

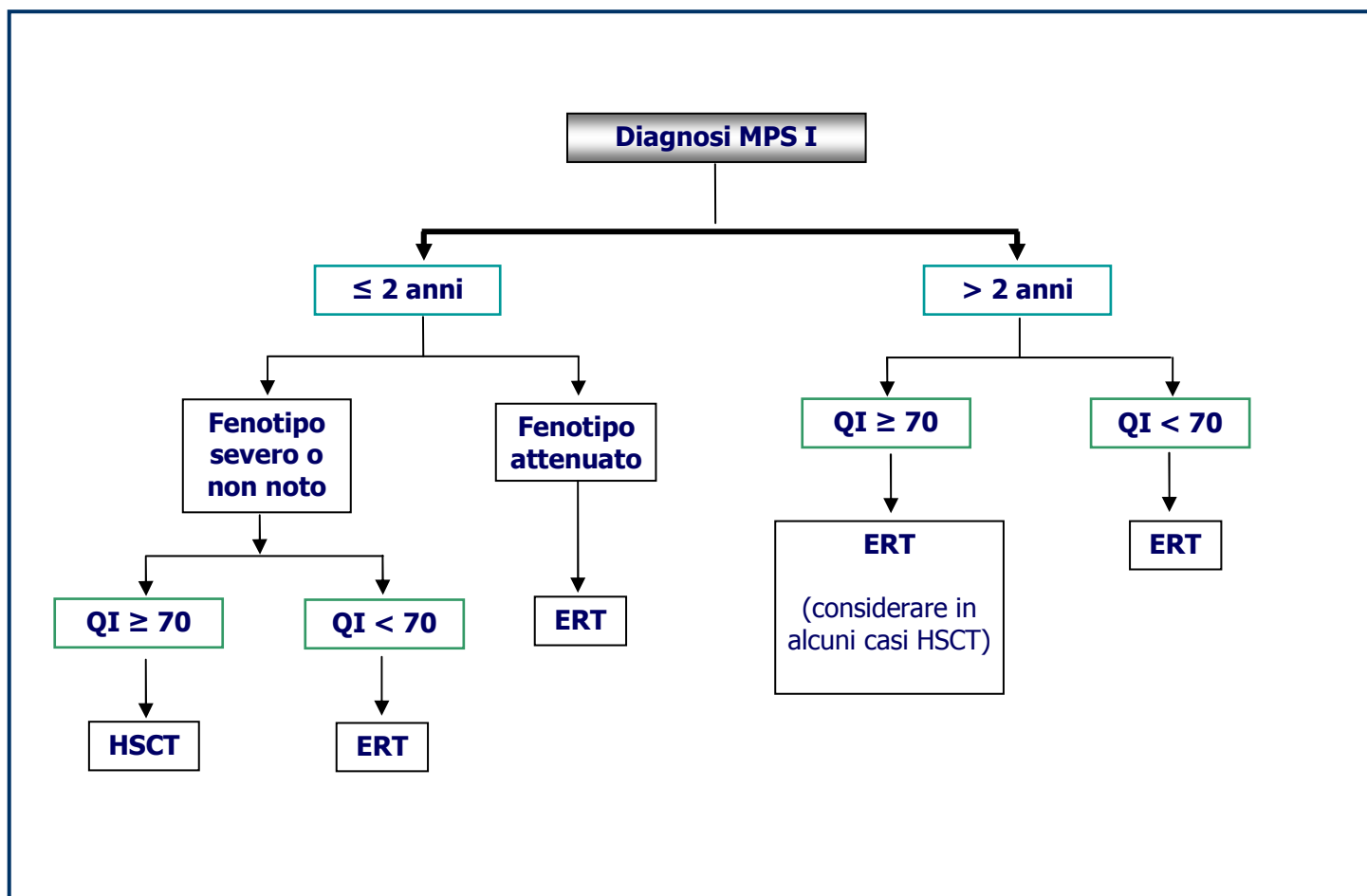
### ***2.5.2 Trapianto di cellule staminali emopoietiche***

Da più di vent'anni il trapianto di cellule staminali del sistema ematopoietico (HSCT) prelevate dal midollo osseo (BMT), dal sangue periferico (PBSCT) e negli ultimi anni dal cordone ombelicale (CBT) di donatori correlati o non correlati, è utilizzato per trattare pazienti con malattie lisosomiali, allo scopo di fornire cellule metabolicamente funzionanti in modo da correggere il deficit enzimatico. HSCT ha lo scopo di rimpiazzare le cellule ematopoietiche del paziente ricevente con le cellule wild-type del donatore secernenti l'enzima normale, dopo ablazione del midollo osseo del ricevente (Guffon et al. 1998). L'enzima lisosomiale rilasciato dalle cellule normali del donatore può essere internalizzato dalle cellule dell'ospite, che ne sono prive, con conseguente eliminazione del substrato metabolico o del materiale d'accumulo (cosiddetta correzione crociata). La decisione trapiantologica per lo specifico caso deve essere frutto di un'articolata ed esaustiva valutazione del paziente e di un confronto multidisciplinare, in pieno accordo con la famiglia. L'obiettivo del trapianto non può oggi essere semplicemente la sopravvivenza con un adeguato livello enzimatico, ma la sopravvivenza con le migliori capacità intellettive e autonomia personale possibili in grado di tradursi nel mantenimento di un'adeguata qualità di vita. Il successo clinico dell'HSCT dipende non solo dal tipo di donatore e dalla capacità di attecchimento del trapianto, ma soprattutto dall'età del bambino al momento del trapianto e dal suo grado di compromissione d'organo e neurologica. Il deterioramento delle funzioni cerebrali inizia precocemente nel bambino con MPS I tipo Hurler non trapiantato e può già essere molto evidente a 2-3 anni d'età, pertanto l'HSCT è il trattamento di scelta per i pazienti con sindrome di Hurler di età inferiore ai 2 anni e con un interessamento minimo o assente del SNC. Attualmente la letteratura internazionale, oltre all'età, considera un QI  $\geq 70$ , come altro criterio fondamentale per definire l'eleggibilità del paziente all'HSCT (**Figura 7**) (Muenzer J et al., 2009).

L'indicazione del limite d'età per l'HSCT, non è, peraltro, assoluta e restrittiva: possono essere individuati pazienti di età superiore, ma con compromissione d'organo ed intellettuale ancora modeste da non controindicare una loro eleggibilità al trapianto. Inoltre, in generale, criterio aggiuntivo per la selezione del candidato è l'assenza di alterazioni d'organo o apparato incompatibili con la tossicità attesa della procedura (ad esempio, frazione d'eiezione cardiaca particolarmente compromessa). Per verificare il successo del trapianto, si può utilizzare la misurazione dell'attività enzimatica nei leucociti. Nei pazienti con MPS I trattati con HSCT è stato dimostrato un aumento dell'attività enzimatica che ha raggiunto valori normali, circa 40-100 giorni dopo il trapianto, nel caso di un donatore sano omozigote. Poiché, in pratica, il donatore è frequentemente un fratello eterozigote, l'aumento riscontrato si fissa a valori intermedi e, cioè, intorno ai 20-60 nmol/mg.hr (Whitley CB et al., 1993; Peters C et al., 1996). L'attecchimento del trapianto determina una rapida riduzione dell'accumulo di GAG nel fegato, nelle tonsille, nella congiuntiva, nel liquido cerebrospinale e nelle urine. Scarsi sembrano gli effetti sull'occhio, sull'apparato scheletrico e sulle manifestazioni valvolari.

Non è chiaro inoltre se l'HSCT possa portare ad una correzione del difetto enzimatico nelle cellule del sistema nervoso centrale, sebbene sia stato dimostrato un incremento dei livelli enzimatici in alcuni modelli animali e nei pazienti studiati. Il meccanismo di correzione sarebbe da riportare a una colonizzazione del sistema nervoso da parte di cellule staminali che si differenziano in neuroglia e producono una certa quota di IDUA (Boelens JJ et al., 2010). La limitazione iniziale all'esecuzione del trapianto di cellule staminali ematopoietiche, eseguito su pazienti con m. di Hurler, era costituita da un'elevata mortalità associata alla patologia ed al regime terapeutico. Negli ultimi anni, il HSCT è diventato una procedura molto più sicura che in passato, con una sopravvivenza superiore al 90%. Oggi, con l'uso del cordone ombelicale, il rischio di rigetto si è estremamente ridotto; sino a

pochi anni fa, circa un terzo dei pazienti presentava rigetto e doveva essere sottoposto ad un secondo trapianto (Boelens JJ et al., 2010).



**Figura 7**

Algoritmo di trattamento per i pazienti con diagnosi di MPS I. (Figura ripresa da Muenzer J et al., *Pediatrics*. 2009 ).

### ***2.5.3 Terapia enzimatica sostitutiva***

Le conoscenze sulla fisiopatologia dei lisosomi e sui meccanismi coinvolti nel targeting degli enzimi lisosomiali hanno costituito il presupposto per le ricerche sull'impiego di una terapia enzimatica sostitutiva (ERT) nelle malattie d'accumulo (Desnick RJ et al., 2002). La ERT prevede l'infusione endovenosa periodica dell'enzima lisosomiale ricombinante wild-type. L'enzima successivamente viene internalizzato dalle cellule del paziente e indirizzato, attraverso la via del mannosio-6-fosfato, verso i lisosomi dove esercita la sua attività catalitica. La malattia di Gaucher tipo I è stata la prima malattia d'accumulo ad essere stata trattata con la ERT. Il successo della ERT nella malattia di Gaucher tipo I ha incoraggiato i ricercatori a sviluppare e a valutare tale strategia terapeutica in altre malattie lisosomiali. Questo impegno è stato incentivato dalla possibilità di clonare il DNA e i geni che codificano la maggior parte degli enzimi lisosomiali e dalla disponibilità di nuove tecnologie tra le quali lo sviluppo di sistemi eucariotici per produrre grandi quantità di enzima ricombinante e l'uso di tecniche di "gene targeting" per creare modelli di topi knockout per studi preclinici della ERT. Attualmente è disponibile la ERT per i pazienti con malattia di Gaucher, di Fabry, di Pompe e Mucopolisaccaridosi tipo I, II, VI (Sly WS et al., 2002; Beck M, 2010). Nel 1991, a seguito della clonazione del gene per l' $\alpha$ -L-iduronidasi, sono iniziati i primi studi sulla ERT nella MPS I. La produzione su larga scala di questo enzima è stata messa a punto su cellule di ovaio di criceto (CHO) utilizzando la tecnologia del DNA ricombinante (Kakkis ED et al., 1994). L'efficacia della ERT è stata dapprima studiata in un modello canino di MPS I al quale era stato somministrato, con cadenza settimanale, la ERT con laronidasi (rhIDUA), alla dose di 25 U/Kg (0.1 mg/Kg) successivamente modificata a 100 U/Kg. Dopo circa 13 mesi gli animali trattati si mostravano molto più attivi rispetto a quelli non sottoposti ad alcun trattamento. Veniva rilevato, inoltre, aumento di peso e miglioramento della motilità articolare (Shull RM et al., 1994). Studi biochimici ed istologici hanno dimostrato captazione dell'IDUA e riduzione dell'accumulo di GAG nel fegato, rene, milza, polmone, linfonodi ed

articolazioni. In tutti gli animali trattati era stata osservata la produzione di anticorpi anti-rhIDUA, la formazione di immunocomplessi e proteinuria. Non venivano osservate modifiche significative della sintomatologia a carico del sistema nervoso centrale poiché l'enzima non era in grado di attraversare la barriera ematoencefalica.

Alla luce dei risultati promettenti di questi studi, nel 2001 veniva iniziata da Kakkis et al., la sperimentazione clinica con rhIDUA in pazienti affetti da MPS I (Kakkis et al., 2001). In questo trial clinico furono sottoposti alla terapia 10 pazienti (età compresa tra 6-23 anni) ai quali era stata somministrata IDUA ricombinante per via endovenosa alla dose di 100U/kg a settimana (0.58 mg/Kg/settimana). I primi risultati (dopo 52 settimane di trattamento) dimostravano una significativa riduzione delle dimensioni di fegato e milza (rispettivamente del 25% e 20%).

Dopo appena quattro settimane di trattamento veniva osservata una riduzione del 60% dei GAG urinari e dopo 52 settimane tale riduzione risultava in media pari a 63% (range 53 – 74%). Anche la motilità articolare risultava migliorata. Veniva registrata, inoltre, una riduzione del 61% del numero di episodi di apnea; solo uno dei pazienti mostrava un peggioramento dell'apnea notturna. In tutti i 10 pazienti era stato riscontrato un miglioramento variabile da 1 a 2 classi NYHA dell'insufficienza cardiaca. Nei 6 pazienti in età pre-pubere i tassi medi di crescita risultavano aumentati da 2.8 cm/anno nella fase pre-trattamento a 5.17 cm/anno a 52 settimane e la crescita ponderale media passava da 1.66 Kg/anno a 3.83 Kg/anno. Non venivano osservati miglioramenti dell'opacità corneale. Durante questo studio in tutti i pazienti, la somministrazione del farmaco aveva determinato la comparsa di qualche effetto collaterale, sebbene tali effetti si mostravano meno severi di quelli che si prevedevano sulla base degli studi effettuati sui modelli canini. Tra gli effetti collaterali rilevati, le reazioni di ipersensibilità al farmaco erano le più frequenti e comprendevano orticaria ricorrente, febbre, brividi; tali reazioni di semplice gestione, diminuivano nel tempo. In quattro pazienti furono trovati anticorpi specifici contro rhIDUA, generalmente accompagnati da attivazione subclinica del complemento (Kakkis et al., 2001). Successivamente, ulteriori esperienze hanno confermato l'efficacia della ERT nel trattamento della

MPS I; tra queste particolarmente significativa è risultata quella legata allo studio multinazionale, in doppio cieco, controllato con placebo condotto su 45 pazienti affetti da MPS I (Wraith JE et al., 2004). In questo studio i due gruppi (22 in trattamento e 23 controllati con placebo) erano omogeneamente distribuiti in riferimento a età, sesso e fenotipo clinico. Dopo lo studio in doppio cieco, durato 26 settimane, il trattamento è stato esteso a tutti i 45 pazienti; i risultati di tale studio furono sostanzialmente sovrapponibili con i dati riportati da Kakkis nel 2001. In questo studio inoltre veniva osservato, dopo 26 settimane di trattamento, nei pazienti riceventi la ERT rispetto ai pazienti che ricevevano il placebo, in media un miglioramento di 38.1 metri durante il test del cammino dei 6 minuti (6MWT). Il farmaco, che, inizialmente era stato fornito dalla “Genzyme” per uso compassionevole, è stato poi autorizzato all’immissione in commercio dalla Food and Drug Administration (FDA) negli USA nell’aprile 2003 e dalla Commissione Europea nel giugno dello stesso anno con il nome di Aldurazyme. Attualmente è noto, così come per le altre malattie lisosomiali per le quali è disponibile la ERT (es. Malattia di Pompe, Mucopolisaccaridosi tipo II, VI etc.), che i diversi organi coinvolti nella MPS I rispondono in modo differente alla ERT e anche i tempi di risposta sono differenti (es. 3 mesi per i GAG, 12 mesi per la visceromegalia). La variabilità di risposta al trattamento potrebbe essere correlata alla differente capacità di distribuzione dell’enzima ricombinante nei diversi tessuti coinvolti e all’età in cui viene iniziato il trattamento. Infatti, l’esperienza riportata recentemente da Gabrielli et al. sembra suggerire che l’inizio precoce della ERT, in particolare per le forme attenuate, possa significativamente ritardare o addirittura prevenire l’insorgenza dei segni clinici maggiori della MPS I, modificando in tal modo la storia naturale della malattia (Gabrielli et al., 2010). I risultati riportati in letteratura hanno mostrato che il trattamento enzimatico con rhIDUA è ben tollerato sia nei bambini che negli adulti. Tra gli effetti collaterali rilevati, le reazioni di ipersensibilità al farmaco sono le più frequenti e comprendono febbre, reazioni cutanee in corrispondenza del sito di iniezione, rash, artralgie, cefalea, orticaria ricorrente, dolore addominale, brividi; tali reazioni, di semplice gestione, diminuiscono nel tempo. Dai dati riportati in letteratura, risulta che il 93% dei pazienti trattati con rhIDUA sviluppa anticorpi



anti-enzima della classe IgG; tuttavia, tali anticorpi non sembrano limitare l'efficacia e la sicurezza della ERT (Clarke LA et al., 2009). Nel 2009 sono state pubblicate le linee guida internazionali per un adeguato management dei pazienti con MPS I (Muenzer J et al., 2009).

## 2.6 SCOPO DELLO STUDIO

I dati finora disponibili in letteratura sull'efficacia della ERT nella MPS I sono relativi a poche decine di pazienti, peraltro tra loro eterogenei in riferimento alle manifestazioni fenotipiche. Tali esperienze risultano, inoltre, limitate nel tempo essendo i primi risultati clinici rilevabili a partire dal 2001. Il Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", con la collaborazione del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, ha seguito 11 pazienti in ERT per periodi variabili; in questo lavoro il nostro obiettivo è stato quello di caratterizzare tutti i pazienti con MPS I dal punto di vista molecolare per eventuali studi di correlazione genotipo-fenotipo e valutare l'efficacia e la sicurezza della ERT con  $\alpha$ -L-iduronidasi ricombinante in tutti i pazienti trattati, al fine di aggiungere il proprio contributo ai dati finora disponibili in letteratura.

## 2.7 PAZIENTI E METODI

### 2.7.1 *Pazienti*

Un totale di 11 pazienti affetti da MPS I, ciascuno dei quali con un diverso grado di espressione fenotipica della malattia, sono stati inclusi nello studio. Otto pazienti erano pediatrici e tre pazienti erano adulti, seguiti rispettivamente presso il Dipartimento di Pediatria, con la collaborazione del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale. La ERT con  $\alpha$ -L-iduronidasi ricombinante (rhIDUA) è stata iniziata solo in dieci pazienti (**Tabella 1 e Tabella 2**). Degli otto pazienti pediatrici, 4 erano maschi e 4 erano femmine, con un range di età compreso tra 4 e 10 anni e una media di 6 anni. Dei pazienti pediatrici, il 75 % presentavano un fenotipo severo. Tra i pazienti pediatrici abbiamo:

- Un paziente di 10 anni (CM) con fenotipo intermedio, nato a termine da gravidanza normocondotta, da genitori non consanguinei; normale l'acquisizione delle tappe dello sviluppo psicomotorio. All'età di 9 mesi era stata riscontrata cifosi dorso-lombare, macrocrania, facies grossolana ed epatomegalia. Giungeva per la prima volta presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università Federico II di Napoli all'età di 17 mesi. All'esame obiettivo il paziente presentava facies gargoile simile, dolicocefalia, macrocrania, ipertrofia gengivale, macroglossia, epatomegalia, limitazione articolare al gomito (bilateralmente), accentuata cifosi dorso-lombare. Sulla base del quadro clinico veniva posto il sospetto di MPS I, confermato dal dosaggio su fibroblasti dell'IDUA (0,07 nmoli/h/mg v.n. 29-478). A settembre del 2002, all'età di 4 anni, iniziava la ERT con  $\alpha$ -L-iduronidasi ricombinante. L'esame ecocardiografico con Doppler, effettuato al momento dell'inizio della terapia ( $T_0$ ), mostrava un ispessimento della porzione

anteriore e basale del setto interventricolare di grado moderato, un ispessimento dei lembi valvolari della mitrale e dell'aorta con ipomobilità dei lembi; rigurgito mitralico di lieve entità; un ispessimento dei lembi della tricuspide di grado lieve con rigurgito tricuspidalico di lieve entità con pressione in ventricolo destro pari a 26 mmHg; normali dimensioni delle cavità e spessori parietali. La contrattilità risultava nei limiti. Il quoziente di sviluppo, valutato a  $T_o$ , utilizzando la scala di Griffiths, era risultato pari a 76 (v.n. 94-100). Il ritardo era stato determinato principalmente dal deficit motorio e di coordinazione-performance. Adeguate all'età risultavano le capacità verbali, di ragionamento e sociali. L'esame audiometrico ( $T_o$ ) evidenziava ABR presenti in soglia a 80 dB SPL in AS e 100 dB SPL in AD; timpanogrammi piatti, riflessi stapediale assenti. Tali rilievi risultavano compatibili con un'ipoacusia di tipo misto bilaterale più accentuata a destra. I potenziali evocati visivi (PEV) praticati con stimolazione flash evidenziavano in entrambi gli occhi tracciati marcatamente ridotti in ampiezza per latenza. La RMN basale evidenziava un quadro di leucoencefalopatia secondaria a mucopolisaccaridosi per la presenza, a livello della sostanza bianca sopratentoriale, sia a sede sottocorticale che profonda, di multiple aree, iperintense nelle immagini DP e T2 dipendenti, compatibili con focolai di demielinizzazione e/o gliosi. Si rilevava inoltre diffusa dilatazione degli spazi perivascolari di Virchow-Robin, della sostanza bianca sopratentoriale (soprattutto in regione parieto-occipitale), con assottigliamento del corpo calloso. CM è stato trattato con ERT per 18 mesi.

- Un paziente di 10 anni (CB) con fenotipo attenuato, nato a termine, da gravidanza normodecorsa mediante TC, da genitori non consanguinei. Normale acquisizione delle tappe di sviluppo psicomotorio. A tre anni riscontro di rigidità in flessione di tutte le dita delle mani, con

impossibilità alla chiusura del pugno e all'estensione completa. Per tale motivo praticava controllo clinico presso l'Unità di Malattie Reumatiche presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università Federico II di Napoli. Le indagini praticate in tale occasione (fattore reumatoide, titolo antistreptolisinico, Vidal-Wright, CIC, ANA, Ig totali) risultavano tutte nella norma. All'esame obiettivo veniva rilevata macrocrania, limitazione della flessione estensione del gomito, del ginocchio e della prono-supinazione del polso bilateralmente, limitazione all'estensione delle dita delle mani, con atteggiamento in camptodattilia bilateralmente e limitazione funzionale anche a carico dell'articolazione scapolo-omeroale bilateralmente. Non si evidenziavano tumefazione articolari. La visita oculistica rilevava la presenza di distrofia corneale caratterizzata da tenui accumuli stromali. Sulla base del quadro clinico osservato, veniva posto il sospetto di MPS I, confermato dal dosaggio dei mucopolisaccaridi urinari, risultati elevati (193 mg GAG/g creatinina, v.n.:  $65 \pm 17$ ) e dell'attività enzimatica IDUA su leucociti, risultata patologica. La diagnosi finale è stata: MPS I, tipo Scheie. L'analisi molecolare del gene IDUA ha evidenziato la presenza delle mutazioni 134del12 e G265R. A distanza di tre mesi dalla diagnosi ha iniziato la ERT con Aldurazyme. Per ulteriore inquadramento diagnostico praticava a T<sub>0</sub> valutazione psicomotoria (test WPPSI) che evidenziava reattivi verbali 66, reattivi di performance 76 e riduzione di grado lieve dello sviluppo psicomotorio (QI = 68, v.n.: 94 - 100). Veniva rilevato inoltre lieve deficit dell'attenzione e lieve difficoltà oculo-motoria. L'esame ECG risultava nella norma, mentre l'esame ecocardiografico con Doppler, mostrava il setto interventricolare ai limiti alti della norma (9 mm, v.n.: 5.5 - 9), dilatazione dell'aorta ascendente (27 mm, v.n.: 17 - 24), ispessimento dei lembi valvolari della mitrale e dell'aorta. Veniva inoltre osservata un'insufficienza mitralica di grado lieve-moderato con presenza di doppio jet e un'insufficienza della

tricuspide di grado lieve. Le dimensioni delle cavità e gli spessori parietali risultavano normali (ventricolo sinistro: DD 36 mm, DS 22 mm; FA: 40%). La contrattilità era nei limiti. L'esame audiometrico (T<sub>0</sub>) evidenziava un ipoacusia di trasmissione bilaterale. La RMN encefalo effettuata prima dell'inizio della ERT evidenziava una modesta riduzione del volume della sostanza bianca sopratentoriale, più accentuata nelle regioni occipito-parietali, con dilatazione ex vacuo dei ventricoli laterali. Inoltre, nella sostanza bianca sopratentoriale profonda residua erano presenti multiple dilatazioni degli spazi perivascolari di Virchow-Robin e sfumata iperintensità delle regioni peritrigonali e del corpo calloso, per dismielinizzazione. Risultava, inoltre modicamente ridotto il diametro antero-posteriore del forame occipitale per lieve ispessimento dei tessuti ligamentosi periodontoidei, in assenza tuttavia di compressioni o alterazioni di segnale a carico della giunzione bulbo-midollare. Lo studio dei potenziali evocati visivi (PEV) eseguito a T<sub>12</sub> evidenziava un danno della conduzione lungo le vie visive in entrambi gli occhi. CB è stato trattato con ERT per un periodo di 48 mesi.

- Una bambina di 9 anni (IV) con fenotipo severo che ha ricevuto la diagnosi tardivamente, (all'età di 4 anni). IV nata pretermine da gravidanza gemellare, da genitori non consanguinei. Alla nascita praticava ecografia cerebrale risultata nella norma. A 5 mesi intervento per ernia inguinale sinistra. A 6 mesi veniva riscontrato un ritardo dello sviluppo psicomotorio, per tale motivo praticava TC cerebrale che evidenzia una dilatazione del IV ventricolo, cisti cerebellare sinistra, associata ad idrocefalo triventricolare trattato con derivazione ventricolo-cisto-peritoneale sinistra. Dopo 6 mesi, venivano riscontrati due ematomi subdurali sub-acuti-cronici biemisferici, sinistro e per tale motivo la paziente veniva sottoposta ad intervento neurochirurgico di evacuazione degli ematomi. Le

indagini neuroradiologiche effettuate successivamente documentano l'avvenuta evacuazione delle raccolte ematiche in assenza di idrocefalo e con segni di marcata atrofia cerebrale. Iniziava, quindi, controlli periodici. Nel corso del follow-up per il riscontro di macrocrania, dismorfismi del volto (aspetto del volto a tipo "gargoile"), ipertrofia gengivale, macroglossia, ipertricosi diffusa, ritardo psicomotorio, epatosplenomegalia con anamnesi positiva per infezioni respiratorie ricorrenti veniva posto il sospetto di malattia da accumulo lisosomiale. Per un ulteriore inquadramento diagnostico veniva effettuato esame ecocardiografico che evidenziava una modesta ipertrofia ventricolare sinistra e controllo oculistico che rilevava la presenza di opacità corneali. La valutazione cognitiva della bambina attraverso la scala di Griffiths rilevava un quoziente di sviluppo di 33, indicativo di grave ritardo dello sviluppo psicomotorio. Veniva effettuato dosaggio dei mucopolisaccaridi urinari che risultava patologico. Veniva pertanto posto il sospetto di MPS I confermato attraverso il dosaggio dell'attività dell'IDUA su leucociti, risultato assente. L'esame molecolare del gene IDUA evidenziava la mutazione W402X in omozigosi. Veniva pertanto, all'età di quattro anni, posta la diagnosi di MPS I, tipo Hurler. Data l'età della bambina (quattro anni) e per la presenza di grave ritardo cognitivo veniva esclusa la possibilità di effettuare il trapianto di cellule staminali ematopoietiche e veniva posta indicazione per la terapia enzimatica sostitutiva con Aldurazyme. All'età di quattro anni e sei mesi, dopo 2 mesi dall'inizio della terapia enzimatica sostitutiva, la paziente ha presentato progressiva ipostenia ai quattro arti con peggioramento delle acquisizioni motorie già modeste, evoluta poi in un quadro di tetraparesi completa. Praticava pertanto RMN encefalo-midollo che evidenzia una stenosi del canale cervicale a livello della giunzione e dei primi metameri cervicali. Lo studio elettrofisiologico documentava un'alterazione dei potenziali evocati registrati a livello

del midollo cervicale. Veniva posta diagnosi di sofferenza midollare a quel livello. La paziente veniva sottoposta a intervento chirurgico di decompressione posteriore della colonna cervicale C<sub>0</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> (laminectomia decompressiva C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> e parziale C<sub>0</sub>) associata a stabilizzazione della colonna C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub> con barre metalliche e artrodesi. Data l'inevitabilità post-operatoria del rachide cervicale associata alla macroglossia, in previsione di eventuali procedure chirurgiche veniva effettuata tracheotomia. Dopo l'intervento la paziente ha recuperato in parte la motilità agli arti superiori, mentre agli arti inferiori si è assistito solo a un modesto recupero della motilità, prevalentemente flessoria. Al controllo neuroradiologico post-intervento, la RMN mostrava sistema ventricolare modicamente dilatato, iperintensità di segnale gliotica in sede periventricolare a livello dei centri semiovali, soprattutto a sinistra. La piccola IV è stata trattata con ERT per 48 mesi.

- Un bambino di 6 anni (MF) con fenotipo severo che ha ricevuto la diagnosi di MPS I all'età di 3 anni. Nato alla 38 settimana di gestazione mediante PE, da gravidanza complicata da minaccia d'aborto a 6° mese. All'età di 8 mesi, veniva riscontrato lineamenti grossolani del volto, mani tozze, rigidità articolare alle dita delle mani, epatosplenomegalia, cifosi, ernia ombelicale e ritardo dello sviluppo psicomotorio di grado lieve-moderato. All'anamnesi veniva rilevato la positività per infezioni respiratorie ricorrenti. A 3 anni, sulla base del quadro clinico veniva posto il sospetto di MPS I presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università Federico II di Napoli. Il dosaggio dei GAG urinari (423 mg GAG/ gr creatinina; v.n.: 65 ± 17) e dell'attività dell'IDUA su leucociti risultavano patologici e pertanto veniva confermata la diagnosi di MPS I, tipo Hurler e iniziava il trattamento con enzima ricombinante (Aldurazyme). L'analisi molecolare del gene IDUA evidenziava la presenza delle mutazioni



Q70X e R628X. Per ulteriore inquadramento diagnostico praticava a T<sub>0</sub> valutazione psicomotoria (valutato mediante GRIFFITHS MENTAL SCALE) che evidenziava ritardo dello sviluppo psicomotorio (QS = 66 v.n: 94 - 100). L'esame ECG risultava nella norma, mentre l'esame ecocardiografico con Doppler, mostrava un ispessimento di grado lieve-moderato dei lembi valvolari della mitrale e cuspidi aortiche con ridotta escursione sistole-diastolica. Le dimensioni delle cavità e gli spessori parietali risultavano normali. L'esame audiometrico (T<sub>0</sub>) evidenziava un ipoacusia neurosensoriale bilaterale. Al controllo oftalmologico veniva evidenziata la presenza di opacità corneale stromale diffusa in ambo gli occhi (OD > OS). Lo studio dei potenziali evocati visivi (PEV) eseguito a T<sub>0</sub> evidenziava un danno della conduzione lungo le vie visive in entrambi gli occhi. MF è stato trattato con ERT per un periodo di 24 mesi.

- Una bambina di 6 anni (DVM) con fenotipo grave. DVM, nata a termine mediante TC da gravidanza normocondotta fino al 6 mese, complicata poi dalla comparsa di contrazioni uterine e ipotiroidismo materno. Nel corso dei primi mesi di vita la piccola presentava ricorrenti episodi di infezione delle prime vie aeree. Giungeva per la prima volta alla nostra osservazione all'età di 11 mesi nel sospetto di malattia da accumulo. All'esame obiettivo all'ingresso la paziente presentava note dismorfiche (fronte spaziosa e prominente, accenno alla sinofria), macrocefalia, gibbo lombare, parziale rigidità articolare in particolare all'arto superiore con ridotta capacità di pronosupinazione, lieve epatomegalia ed ernia ombelicale. Nel corso del ricovero veniva effettuata la valutazione del quoziente di sviluppo risultata nella norma (QS = 90, età di sviluppo di 10 mesi) e la consulenza oculistica che evidenziava la presenza di opacità corneali stromali, diffuse in entrambi gli occhi. La radiografia del bacino evidenziava bilateralmente ipoplasia del segmento sopracotiloideo

dell'ileo con marcata spiovenza dei tetti acetabolari. L'esame ecocardiografico mostrava un lieve ispessimento delle pareti del ventricolo sinistro; buona la cinesi e la funzione del ventricolo sinistro; minimo jet da rigurgito tricuspidalico para-fisiologico. Apparati valvolari nella norma. In base al quadro clinico veniva posto il sospetto di MPS I confermato dal dosaggio dei mucopolisaccaridi urinari, risultati aumentati (332 mg GAG/g creatinina, v.n.  $65 \pm 17$ ) e dal dosaggio dell'attività dell'IDUA su leucociti, risultato assente. La ricerca delle mutazioni del gene dell'IDUA evidenziava le mutazioni Q70X e P496R, entrambe in eterozigosi. Veniva pertanto, posta la diagnosi di MPS I, tipo Hurler e iniziava ERT con Laronidasi (Aldurazyme). In considerazione dell'età della bambina (< 2 anni) e del quadro clinico (in particolare l'assenza di compromissione neurologica), la bambina veniva considerata eleggibile per trapianto di cellule staminali ematopoietiche. Ha praticato ERT per 4 mesi ma dopo soli tre mesi di trattamento è stata sottoposta, all'età di 16 mesi, a trapianto di cellule staminali ematopoietiche midollari da donatore non correlato presso l'Ospedale San Gerardo di Monza.

- Una bambina di 5 anni (DF) con forma grave di MPS I. DF era nata a termine da gravidanza normocondotta. Normale l'evoluzione dei fenomeni perinatali. A 12 mesi, per la presenza di macrocefalia, caratteristiche dismorfiche del volto, gibbo dorsale, ritardo psicomotorio e anamnesi positiva per infezioni delle alte vie respiratorie, riceveva la diagnosi di MPS I, confermata dal dosaggio dei mucopolisaccaridi risultati aumentati (184 mg GAG/g creatinina, v.n.  $114 \pm 17$ ) e dall'assenza totale dell'enzima IDUA su linfociti. Veniva così posta la diagnosi di MPS I, tipo Hurler. La ricerca delle mutazioni del gene dell'alfa-L-iduronidasi evidenziava le mutazioni Q70X e P469R, entrambe in eterozigosi. Giungeva alla nostra osservazione, all'età di 15 mesi, per iniziare il trattamento con enzima

ricombinante. All'ingresso veniva effettuata ecografia dell'addome che evidenziava epatomegalia; la radiografia del bacino evidenziava un'ipoplasia del segmento supracotiloideo dell'ileo, lateralizzazione ed ipoplasia del nucleo epifisario femorale. Veniva pertanto posta la diagnosi di displasia dell'anca bilateralmente. L'esame ecocardiografico, escludeva la presenza di anomalie emodinamiche di rilievo. La valutazione psicomotoria evidenziava un lieve ritardo psicomotorio (QS = 71, v.n. 94 – 100) e un età di sviluppo di 11 mesi e ½. La RMN encefalo evidenziava la presenza di idrocefalo tetraentricolare con prevalenza sovratentoriale, pertanto veniva sottoposta ad intervento di derivazione ventricolo-peritoneale. Dopo un'attenta valutazione del quadro clinico della piccola e data l'età (15 mesi), la bambina risultava eleggibile per il trapianto di cellule staminali. Dopo 6 mesi di terapia con ERT riceveva, all'età di 21 mesi, il trapianto di cellule staminali ematopoietiche presso l'Ospedale San Gerardo di Monza.

- Una bambina di 4 anni (DLI) con fenotipo severo, nata a termine da gravidanza normodecorsa mediante TC. A 2 mesi, veniva riscontrata ernia inguinale sinistra riducibile, corretta chirurgicamente. A 6 mesi, veniva rilevato soffio cardiaco e per tale motivo praticava ecocardio che evidenziava un prolasso del lembo posteriore della valvola mitralica con insufficienza di grado moderato senza dilatazione dell'atrio sinistro. Successivamente per il riscontro di lineamenti grossolani del volto associato a limitazione di grado lieve della prono-supinazione in entrambi gli avambracci, veniva posto il sospetto di malattia d'accumulo, confermato dal dosaggio dei mucopolisaccaridi urinari, risultati patologici (509 mg GAG/g creatinina) e dal dosaggio dell'alfa L-iduronidasi, su linfociti, risultata assente (0 nmol/h/mg di proteine). L'analisi molecolare del gene IDUA evidenziava la presenza delle mutazioni Q70X e P469R.

Veniva pertanto posta la diagnosi di MPS I-H e iniziava la terapia con ERT. Dopo circa tre mesi dall'inizio della terapia enzimatica, la piccola è stata sottoposta all'età di 12 mesi a trapianto di cellule staminali ematopoietiche midollari presso l'Ospedale San Gerardo di Monza.

- Un bambino di 4 anni (LS) con fenotipo severo, nato a termine mediante TC da gravidanza normodecorsa, da genitori consanguinei. Anamnesi perinatale riferita nella norma. Alla nascita riscontro di ernia ombelicale. A 6 mesi intervento di ernia inguinale bilateralmente, successivamente recidivate. A 8 mesi riscontro di gibbo dorsale, epatomegalia, mani tozze e aspetto grossolano del volto. Anamnesi positiva per infezioni respiratorie ricorrenti. A 14 mesi, riscontro di RSPM. Sulla base del quadro clinico veniva posto il sospetto di malattia d'accumulo. Praticava pertanto il dosaggio dei GAG urinari risultati fortemente patologici (781 mg GAG/ gr creatinina; v.n.:  $65 \pm 17$ ); il dosaggio dell'attività enzimatica IDUA su leucociti risultava patologico (0 nmol/h/mg proteine). La diagnosi finale è stata MPS I, tipo Hurler. L'analisi molecolare del gene IDUA evidenziava la presenza della mutazione c.1171\_1172insCCATGG in omozigosi. All'età di 21 mesi, poiché il piccolo presentava un adeguato quoziente di sviluppo (QS = 81 valutato con GRIFFITHS MENTAL SCALE) è stato sottoposto a trapianto di cellule staminali ematopoietiche midollari da donatore familiare presso la Clinica Pediatrica dell'Ospedale San Gerardo di Monza. In questo paziente non è mai stata effettuata la ERT con rhIDUA (**Tabella 1**).

Dei tre pazienti adulti, 1 paziente era femmina e gli altri due pazienti erano maschi con età media di 29 anni. Dei pazienti adulti, tutti presentavano una malattia attenuata:

- Una paziente (MC) con fenotipo intermedio, nata a termine da gravidanza normocondotta, da genitori non consanguinei. Alla nascita veniva riscontrato macrocefalia ed ernia ombelicale. All'età di 2 anni, veniva evidenziata facies grossolana, macrocefalia, epatosplenomegalia, gibbo dorsale, lieve limitazione articolare del movimento di pronosupinazione degli arti superiori e atteggiamento in flessione del quinto dito della mano sinistra. La visita oculistica evidenziava la presenza di opacità puntiformi a livello corneale, l'esame audiometrico rilevava timpanogramma piatto bilateralmente con assenza dei riflessi stapediai. Sulla base del quadro clinico veniva effettuato il dosaggio su fibroblasti dell'IDUA, risultato profondamente carente e veniva posta diagnosi di MPS I tipo Hurler/Scheie. Nel maggio del 2003, ovvero all'età di 24 anni, iniziava ERT con Aldurazyme. L'esame ecocardiografico Doppler, effettuato all'inizio della terapia (T<sub>0</sub>) evidenziava lembi valvolari mitralici notevolmente fibrosclerotici, prolasso olosistolico del lembo posteriore; valvola tricuspide con inserzione alta del lembo laterale che mostrava prolasso olosistolico; insufficienza mitralica e tricuspidalica lieve-moderata, insufficienza aortica e polmonare di grado lieve-moderato; si registrava inoltre un modesto aumento della pressione sistolica del ventricolo destro ed una ipertrofia eccentrica del ventricolo sinistro; radice aortica e valvole semilunari sclerotiche. Atrio sinistro con dimensioni aumentate in senso cranio-caudale e ventricolo destro lievemente dilatato. Veniva posta diagnosi di "insufficienza cardiaca di II grado NYHA". La paziente è stata trattata con ERT con laronidasi per 16 mesi.
- Un paziente (CR) con fenotipo lieve, nato pre-termine con TC da genitori non consanguinei; normale lo sviluppo psicomotorio. All'età di 6 anni e 4 mesi il paziente presentava una sintomatologia caratterizzata da compromissione della motilità delle articolazioni di

entrambe le mani; successivamente riceveva la diagnosi di sindrome del tunnel carpale. Durante i controlli clinici successivi veniva rilevato anche un ispessimento dei lembi valvolari mitralici. A 7 anni e 2 mesi si assisteva ad un peggioramento della compromissione articolare, in particolare delle interfalangee prossimali e distali e delle metacarpo falangee, con atteggiamento in flessione e difficoltà alla prensione. Veniva rilevato, inoltre, un atteggiamento in flessione delle ginocchia. Sulla base del quadro clinico veniva posto il sospetto di MPS I, confermato, poi, dal dosaggio dei mucopolisaccaridi urinari, risultati patologici (17 mg/24 ore, v.n.  $3,3 \pm 1,2$  tra 5 e 7 anni;  $5,2 \pm 1,6$  tra 7 e 9 anni) e dal dosaggio dell'attività dell'  $\alpha$ -L- iduronidasi risultata carente (0,75 nanoU v.n. 28-112). L'analisi molecolare del gene IDUA evidenziava la presenza delle mutazioni 974ins12 e la mutazione di senso P496R. La diagnosi finale è stata di MPS I, tipo Scheie. All'età di 19 anni, ha iniziato la ERT con laronidasi. L'esame ecocardiodoppler effettuato all'inizio della terapia ( $T_0$ ) evidenziava la presenza di lembi valvolari mitralici e aortici iperecogeni e lievemente ispessiti, con apertura dei lembi conservata; insufficienza mitralica lieve-moderata, insufficienza tricuspidalica lieve; lieve dilatazione atriale sinistra e delle camere destre. CR è stato trattato con ERT per un periodo complessivo di circa 6 anni; in questo paziente la compliance alla ERT è risultata scarsa in alcuni periodi.

- Un paziente (MR) con fenotipo attenuato, nato a termine da gravidanza normodecorsa da genitori non consanguinei. Normale acquisizione delle tappe dello sviluppo psicomotorio. All'età di 4 anni circa il paziente presentava sintomatologia caratterizzata da evidente limitazione articolare a livello di gomito, spalle e mani bilateralmente, lieve limitazione delle articolazioni coxo-femorali e delle ginocchia, facies caratteristica, lieve epato-splenomegalia, cifosi lombare, lieve ispessimento della valvola mitrale ed aortica, opacità corneale con

normale sviluppo psicomotorio. Sulla base del quadro clinico, veniva posto il sospetto di MPS tipo I, confermato poi, dal dosaggio dei mucopolisaccaridi urinari, risultati patologici: > 30 mg/24 ore (v.n. < 10 mg/ 24 ore) e dal dosaggio dell'attività dell'IDUA risultata indosabile. L'analisi molecolare del gene IDUA evidenziava la presenza della mutazione R89Q in omozigosi. La diagnosi finale è stata MPS I, tipo Scheie. A giugno del 2004, all'età di 28 anni, il paziente ha iniziato la terapia enzimatica sostitutiva con  $\alpha$ -L-iduronidasi ricombinante ed è stato trattato con ERT per un periodo di 5 anni; in questo paziente la compliance alla ERT è risultata molto rigorosa (**Tabella 2**).

### ***2.7.2 Metodi***

In 10 pazienti è stata somministrata rhIDUA con cadenza settimanale ( $\pm 3$  giorni) per via endovenosa alla dose di 100 Unità/Kg (0.58 mg/kg) diluito in una soluzione fisiologica (cloruro di sodio 0.9%) contenente albumina umana sierica allo 0.1%; il volume di infusione totale somministrato è stato di 100 ml (nei pazienti fino a 20 Kg) e di 250 ml nei pazienti di peso superiore. La velocità iniziale di infusione, pari a 2 U/Kg/h, è stata incrementata (in assenza di reazioni avverse) fino ad un massimo di 43 U/Kg/h; il volume totale di infusione è stato somministrato in circa 4 ore ed il paziente è stato monitorato (pressione arteriosa, frequenza cardiaca e frequenza respiratoria) ogni 15 minuti durante la prima ora e ogni 30 minuti per le successive ore fino a 30 minuti dopo la fine dell'infusione. Tale terapia è stata somministrata in ambiente protetto con pronta disponibilità di presidi rianimatori. In tutti i pazienti è stata effettuata la premedicazione, circa un'ora prima dell'infusione, con farmaci antistaminici (difenidramina o idrossilazina) e antipiretici (paracetamolo).



### ***2.7.3 Analisi mutazionale del gene IDUA***

In tutti i pazienti, l'estrazione del DNA genomico da sangue intero è stato ottenuto secondo la metodica del "salting out" descritta da Miller e collaboratori (1988) (Miller SA et al., 1988).

L'analisi molecolare del gene IDUA, è stata praticata presso il Dipartimento Assistenziale di Medicina di Laboratorio & Centro di Ricerca CEINGE dell'Università Federico II di Napoli (*Responsabile: Prof.ssa Paola Di Natale*).

#### ***2.7.4 Programma di valutazione basale e di follow-up dei pazienti con MPS I***

Per i pazienti con MPS I in trattamento con ERT è stato elaborato il seguente programma di follow-up (**Tabella 3**) :

- Ogni 6 mesi controlli dei parametri auxologici oltre ai comuni esami ematochimici e bioumorali, con particolare attenzione alla funzionalità epatica e renale.
- Ogni 6 mesi valutazione della epatosplenomegalia, dell'escrezione urinaria dei GAG e dell'eventuale coinvolgimento cardiaco.
- Una volta all'anno, esecuzione di indagini e consulenze specialistiche per la valutazione della motilità articolare, la resistenza all'esercizio fisico, la funzionalità respiratoria, il coinvolgimento neurologico, oculare e otorinolaringoiatrico.

### ***Interessamento neurologico***

Il coinvolgimento neurologico è stato valutato clinicamente, con indagini radiologiche (TC e RMN) e/o con indagini elettrofisiologiche, comprendenti i Potenziali Evocati Visivi (PEV). In tutti i pazienti è stato valutato il quoziente di sviluppo.

### ***Interessamento respiratorio***

Il coinvolgimento respiratorio e la sua evoluzione nel tempo è stato esaminato oltre che con valutazione di segni e sintomi clinici anche mediante specifiche indagini quali: radiografia standard e TC ad alta risoluzione del torace, e quando possibile anche con test di funzionalità polmonare e polisonnografia. Nei pazienti sottoposti a polisonnografia, è stato valutato l'indice di apnea/ipopnea (A.H.I.) che valuta il numero degli episodi di apnea/ipopnea registrati in un'ora. Sono stati considerati patologici un AHI  $\geq$  10 eventi per ora in pazienti con età  $<15$  anni e  $\geq$  15 eventi per ora in pazienti con età  $\geq$  15 anni.

### ***Interessamento cardiaco***

E' stato valutato con esame clinico specialistico, elettrocardiogramma (ECG) ed ecocardiogramma. Il grado di insufficienza cardiaca è stato valutato secondo le classi della New York Heart Association (NYHA).

### ***Interessamento articolare***

La motilità articolare è stata valutata attraverso misurazioni con goniometro degli angoli di estensione/flessione, abduzione/adduzione, intra/extra-

rotazione delle principali articolazioni (polso, gomito, spalla, anca, ginocchio, piede).

### ***Capacità funzionale***

Per la misurazione della capacità funzionale è stato utilizzato il “six-minute walking test (6MWT)” che consiste nel valutare quanti metri il paziente riesce a percorrere in 6 minuti (v.n. > 320 metri in 6 minuti).

### ***Escrezione urinaria dei GAG***

E' stata valutata in mg/gr creatinina su raccolta delle urine delle 24 ore o su campione estemporaneo di almeno 50 cc. Tale misurazione è stata effettuata presso il Dipartimento Assistenziale di Medicina di Laboratorio dalla Professoressa Paola Di Natale.

### ***Epatosplenomegalia***

L'epato-splenomegalia è stata valutata attraverso indagine ecografica. Sono stati presi in considerazione il diametro longitudinale del lobo dx del fegato e quello longitudinale della milza.

**TABELLA 1 – Caratteristiche dei pazienti pediatrici con MPS I**

								QUADRO CLINICO				
PZ	SESSO	ETÀ (anni)	FENOTIPO	GENOTIPO	ETÀ ESORDIO	ETÀ ALLA DIAGNOSI	TERA PIA con ERT (mesi)	ORGANOMEGALIA	OPACITÀ CORNEALE	RSPM	CARDIOPATIA	LIMITAZIONI ARTICOLARI
CM	M	6	H/S	NP	8 mesi	17 mesi	18	++	+	+/-	+	+++
CB	M	10	S	134del12/G26 5R	3 anni	5 anni	48	+	+	-	+	++
IV	F	9	H	W402X / W402X	6 mesi	4 anni	48	++	+	++	+	++
MF	M	6	H	Q70X / R628X	8 mesi	3 anni	24	+	+	+	+	++
DVM	F	6	H	Q70X / P496R	8 mesi	11 mesi	3 + HSCT	+	+	-	+	++
DF	F	5	H	Q70X / P469R	6 mesi	12 mesi	6 + HSCT	+	+	+	+	+
DLI	F	4	H	Q70X / P469R	6 mesi	7 mesi	3 + HSCT	-	+	-	+	+
LS	M	4	H	c.1171_1172in sCCATGG / c.1171_1172in sCCATGG	6 mesi	17mesi	HSCT	+	+	+	+	+

H=Hurler;H/S= Hurler/Scheie; S= Scheie;

RSPM = Ritardo dello sviluppo psicomotorio; M, maschio; F, femmina; ERT= Terapia Enzimatica Sostitutiva; NP, non praticato; HSCT = trapianto di cellule staminali ematopoietiche; - : assente; +/-: non ben definito; +: lieve; ++: moderato; +++: severo

**TABELLA 2 – Caratteristiche dei pazienti adulti con MPS I**

								QUADRO CLINICO				
PZ	SESSO	ETÀ (anni)	FENOTIPO	GENOTIPO	ETÀ ESORDIO	ETÀ ALLA DIAGNOSI	TERA PIA con ERT	ORGANOMEGALIA	OPACITÀ CORNEALE	RSPM	CARDIOPATIA	LIMITAZIONI ARTICOLARI
MC	F	25	H/S	NP	2 anni	2 anni	16 mesi	++	+	+/-	++	++
CR	M	25	S	974ins12 / P496R	6 anni	7 anni	6 anni	+	+	-	+	+
MR	M	31	S	R89Q / R89Q	3 anni	3 anni	5 anni	+	+	-	+	+++

H=Hurler; H/S= Hurler/Scheie; S= Scheie;

RSPM = Ritardo dello sviluppo psicomotorio; M, maschio; F, femmina; ERT= Terapia Enzimatica Sostitutiva; NP, non praticato; - : assente; +/-: non ben definito; +: lieve; ++: moderato; +++: severo

## TABELLA 3

### Programma basale e di follow-up per i pazienti con MPS I

	Valutazione basale	Ogni 6 mesi	Ogni anno	Ogni 2 anni
<b>Anamnesi</b>				
<ul style="list-style-type: none"> <li>Dosaggio enziatico</li> <li>Analisi molecolare</li> </ul>	<b>X</b>			
<b>Esame fisico generale e parametri vitali</b>	<b>X</b>	<b>X</b>		
<b>Parametri auxologici</b> (Peso, altezza, circonferenza cranica)	<b>X</b>	<b>X</b>		
<b>Routine ematochimica</b>	<b>X</b>	<b>X</b>		
<b>Valutazione neurologica</b>				
<ul style="list-style-type: none"> <li>Esame neurologico</li> </ul>	<b>X</b>		<b>X</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Test psicometrici</li> </ul>	<b>X</b>		<b>X</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>RMN encefalo, rachide, TC cranio e/o giunzione atlanto-occipitale</li> </ul>	<b>X</b>			<b>X</b>
<b>Valutazione oculistica</b> (Acuità visiva, pressione oculare, fondo oculare)	<b>X</b>		<b>X</b>	
<b>Valutazione respiratoria</b>				
<ul style="list-style-type: none"> <li>FCV/FEV1</li> </ul>	<b>X</b>	<b>X</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Polisonnografia</li> </ul>	<b>X</b>		<b>X</b>	
<b>Valutazione cardiologica</b>				
<ul style="list-style-type: none"> <li>ECG</li> </ul>	<b>X</b>	<b>X</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Ecocardio</li> </ul>	<b>X</b>	<b>X</b>		
<b>Valutazione apparato locomotore</b>				
<ul style="list-style-type: none"> <li>Visita fisiatrice e mobilità articolare</li> </ul>	<b>X</b>	<b>X</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>Six-minute walking test</li> </ul>	<b>X</b>	<b>X</b>		
<b>Escrezione urinaria dei GAG</b>	<b>X</b>	<b>X</b>		
<b>Valutazione volume fegato e milza</b> (ecografia )	<b>X</b>	<b>X</b>		

## 2.8 RISULTATI

In questo nostro lavoro, descriviamo i risultati sulla efficacia e la sicurezza della ERT con laronidasi in pazienti affetti da MPS I, trattati per periodi di durata differente. La **Tabella 1 e 2** riportano le caratteristiche alla *baseline* dei pazienti inclusi nel presente studio. Il 55% dei pazienti arruolati presentava un fenotipo severo, mentre il 45% presentava un fenotipo attenuato (27% MPS I-S e il 18% con MPS I H/S).

Degli undici pazienti arruolati, quattro pazienti pediatrici (DVM, DF, DLI, LS), dopo solo pochi mesi di trattamento con ERT, sono stati sottoposti con successo ad HSCT e hanno continuato il follow-up della patologia di base presso il centro trapianti di Monza (**Tabella 1**).

Il paziente pediatrico CM, che presentava un fenotipo attenuato, dopo 17 mesi di trattamento è deceduto per una grave infezione respiratoria, non correlata al trattamento enzimatico. La piccola IV, dopo 6 mesi dall'inizio della ERT con laronidasi, per motivi logistici ha continuato il follow-up presso un altro centro di riferimento per patologie rare. La paziente adulta MC, che ha iniziato il trattamento con laronidasi all'età di 23 anni, ovvero dopo anni di progressivo accumulo, è deceduta dopo 16 mesi di ERT per una grave insufficienza cardiaca. In tutti i pazienti l'opacità corneale è risultata stazionaria. La valutazione audiologica esplorata mediante potenziali evocati (ABR, auditory brainstem response) è risultata nella norma nei pazienti CB, CR, MR mentre in un solo paziente (MF) ha evidenziato un quadro di ipoacusia neurosensoriale bilateralmente.

Il trattamento con laronidasi è stato ben tollerato e sicuro nella maggior parte dei pazienti. Solo tre pazienti (CB, MF, CR) hanno presentato nel corso delle prime 8 infusioni qualche effetto collaterale di lieve entità. In particolare nei pazienti MF e CB durante la terapia è stato registrato un lieve rialzo termico, mentre il paziente CR nel corso delle prime infusioni manifestava rash



cutaneo, che facilmente regrediva con il rallentamento della velocità di infusione.

### ***Interessamento neurologico***

Nel paziente CM, dopo 1 anno di terapia, la RMN encefalo ha mostrato un aumento dell'iperintensità in regione frontale sinistra a sede sottocorticale, compatibile con un aumento dei focolai di demielinizzazione e gliosi. Sono risultati invariati la dilatazione degli spazi neurovascolari, l'ipoplasia del corpo calloso e la macrocrania. La RMN encefalo eseguita a T<sub>18</sub> ha mostrato una netta riduzione della sostanza bianca cortico-sottocorticale e una notevole riduzione di volume del corpo calloso. Risultava invariato l'idrocefalo ventricolare sopratentoriale. L'EEG eseguito dopo 12 mesi di ERT mostrava un'attività elettrica cerebrale di base, in veglia e sonno, male organizzata compatibile con una situazione di sofferenza aspecifica diffusa. L'analisi dei potenziali evocati visivi (PEV) eseguita al T<sub>0</sub>, T<sub>6</sub> e a T<sub>12</sub> non ha mostrato sostanziali modifiche. Il test per la valutazione dello sviluppo mentale (TEST WPPSI), effettuato dopo 13 mesi di ERT, ha evidenziato lieve ritardo mentale (QI = 68) dovuto principalmente alla difficoltà nel riconoscimento degli stimoli sia uditivi che visivi.

Nel paziente CB, dopo 48 mesi di ERT, la valutazione neurologica evidenziava un quadro caratterizzato da notevole compromissione della motricità sia grossolana che fine motoria ma con sufficiente coordinazione occhio - mano. La deambulazione risultava nella norma, possibile sia su punte che talloni. La valutazione dei nervi cranici risultava del tutto normale. La valutazione della forza, del tono e del trofismo agli arti superiori ed inferiori è risultata nella norma. Normoeccitabili risultavano i riflessi osteotendinei. Il QI, valutato mediante TEST CPM - COLOURED PROGRESSIVE MATRICES, è risultato ai limiti inferiori della norma per età (QI =70), ovvero stazionario in confronto alla valutazione basale. Lo studio neuroradiologico, eseguito mediante RMN, dopo 48 mesi di

trattamento con enzima ricombinante ha mostrato un lievissimo incremento volumetrico di alcune dilatazioni di spazi perivascolari di Virchow-Robin a carico della sostanza bianca paratrigonale bilateralmente, mentre risultavano sovrapponibili le altre multiple dilatazioni, localizzate nella sostanza bianca dei lobi occipitali, frontali, parietali e nel corpo calloso. Risultavano del tutto invariati, il grado di ispessimento dei tessuti ligamentosi e capsulari periodontoidei e conseguentemente anche il diametro del forame occipitale. L'analisi dei potenziali evocati visivi (PEV) eseguiti al T<sub>12</sub> e T<sub>48</sub> ha mostrato un lieve peggioramento dei reperti elettrofisiologici compatibile con un grave danno della via esplorata. Lo studio elettrofisiologico del nervo mediano, eseguiti al T<sub>12</sub> e T<sub>48</sub>, ha evidenziato reperti elettrofisiologici compatibili con una sofferenza del nervo mediano di grado severo a dx ed estremo a sx.

Nel paziente MF, dopo 24 mesi di ERT, la valutazione neuro-psicologica ha evidenziato un lieve peggioramento del quoziente di Sviluppo (QS = 54), valutato mediante la somministrazione delle scale per la valutazione dello sviluppo mentale GRIFFITHS, con particolare peggioramento nelle aree del linguaggio e del ragionamento pratico, mentre l'area maggiormente adeguata è risultata essere quella personale sociale. In questo paziente la valutazione clinica neurologica ha evidenziato a T<sub>0</sub> e a T<sub>24</sub> la presenza di normale deambulazione e l'esplorazione dei nervi cranici è risultata non patologica. La valutazione del tono, della forza e del trofismo agli arti superiori ed inferiori non ha mostrato alcuna alterazione. I ROT agli arti superiori ed inferiori sono risultati ipoelicitabili verosimilmente a causa delle limitazioni della mobilità articolare. La RMN encefalo effettuata a T<sub>0</sub>, ha evidenziato in corrispondenza della sostanza bianca sopratentoriale soprattutto profonda ed in minor misura sottocorticale, multipli focolai di dismielinizzazione; dilatazione diffusa degli spazi perivascolari di Virchow-Robin a carico di entrambi gli emisferi ed in minor misura al corpo calloso; dilatazione degli spazi liquorali periferici ai nervi ottici i cui spessore e segnale sono risultati tuttavia normale. Ridotto il diametro antero-posteriore del forame occipitale, in assenza tuttavia di compressioni o alterazioni di segnale a carico della

giunzione bulbo-midollare. In questo paziente non è stato possibile effettuare ulteriori valutazioni neuroradiologiche. Lo studio elettrofisiologico del nervo mediano, eseguiti a T<sub>0</sub> evidenziava reperti elettrofisiologici compatibili con una sofferenza del nervo mediano di grado medio bilateralmente. Dopo un anno di ERT, lo studio della velocità di conduzione del nervo mediano ha evidenziato una marcata progressione della sofferenza del nervo mediano bilateralmente, in quanto i reperti elettrofisiologici mostravano un quadro compatibile con una sofferenza del nervo mediano di grado estremo bilateralmente.

In CR la valutazione neurologica non ha evidenziato segni di patologia focale e sistemica a carico del sistema nervoso centrale e periferico. La RMN encefalo eseguita dopo 24 e 48 mesi di trattamento, non ha mostrato significative variazioni del reperto neuroradiologico, evidenziando una lieve riduzione del volume della sostanza bianca in sede parieto-occipitale bilaterale. Non erano evidenti aree di alterato segnale a carico del tessuto nervoso. Regolare la mielinizzazione cerebello-cerebrale. Risultava lievemente ridotta l'ampiezza del forame occipitale e del tratto cervicale superiore in senso antero-posteriore in corrispondenza del dente dell'epistrofeo per la presenza di ispessimento dei tessuti ligamentosi periodontoidei, in assenza tuttavia di segni da compressione sulle strutture della giunzione bulbo-midollare il cui segnale risultava normale. I potenziali evocati visivi da flash, effettuati dopo 24 e 48 mesi di ERT, hanno evidenziato in ambo gli occhi una risposta di latenza aumentata, e di ampiezza lievemente inferiore ai limiti della norma. Lo studio elettrofisiologico del nervo mediano ha mostrato sia al basale che dopo 5 anni di trattamento con enzima ricombinante normali reperti elettrofisiologici.

In MR la valutazione neurologica non ha evidenziato segni di patologia focale e sistemica a carico del sistema nervoso centrale e periferico. Veniva tuttavia segnalata la presenza di segni da riferire a neuropatia del nervo mediano bilateralmente. In questo paziente, infatti, lo studio della velocità di conduzione del nervo mediano, eseguito dopo 2 e 5 anni di trattamento con

ERT, ha evidenziato reperti elettrofisiologici compatibili con una sofferenza del nervo mediano di grado severo da ambo i lati. La RMN encefalo, eseguita a T<sub>24</sub> e a T<sub>60</sub>, non ha mostrato significative variazioni del reperto neuro radiologico, evidenziando una lieve riduzione del volume della sostanza bianca con dilatazione ex vacuo del sistema ventricolare sopratentoriale con prevalenza del ventricolo laterale di sx. A livello della sostanza bianca sopratentoriale, a sede periventricolare ed alle corone radiate, con prevalenza retrotrigonale, venivano osservate multiple aree di dismielinizzazione. Erano inoltre evidenti multiple fini dilatazioni degli spazi perivascolari di Virchow-Robin a carico della sostanza bianca sopratentoriale soprattutto profonda. Risultavano infine, ispessiti i tessuti ligamentosi periodontoidei, con modesta riduzione dell'ampiezza dello spazio subaracnoideo anteriore antistante la regione bulbo-midollare, in assenza tuttavia di segni da compressione sulle strutture della giunzione bulbo-midollare il cui segnale non risultava alterato.

### ***Interessamento respiratorio***

Nel paziente CM, di età pediatrica, durante il periodo di trattamento abbiamo osservato un incremento degli episodi di apnea e di infezioni respiratorie. Purtroppo, il paziente è deceduto dopo 17 mesi di terapia per l'insorgenza di un'ernia postero-laterale epatica complicata con atelettasia da compressione del polmone destro (**Figura 8**). Resta da chiarire se tale complicanza sia da attribuire alla malattia di base o se, invece, sia in rapporto alla iniziale diminuzione di volume epatico conseguente alla terapia, favorendone l'erniazione nell'emitorace destro.

Nel paziente CB, la valutazione della funzionalità respiratoria mediante spirometria è stata effettuata solo dopo 4 anni dall'inizio della ERT, ed è risultata nella norma. In questo paziente non è stato possibile eseguire la polisonnografia.

Anche nel paziente MF non è stato possibile praticare la valutazione spirometrica poiché il piccolo non è risultato in grado di effettuare tale indagine. In questo paziente la valutazione polisonnografica, effettuata dopo 12 mesi di trattamento con laronidasi, ha evidenziato la presenza di 23 ipopnee e 39 apnee ostruttive, con indice di apnea - ipopnea = 7.8; sulla base di tali risultati è stata posta diagnosi di disturbo respiratorio durante il sonno, caratterizzato prevalentemente da eventi di tipo ostruttivo di grado medio.

Nel paziente CR, la valutazione spirometrica effettuata a  $T_0$  ha evidenziato un coinvolgimento polmonare di tipo restrittivo di lieve entità. Dopo 4 anni di trattamento si è osservato una normalizzazione della funzionalità respiratoria. In questo paziente inoltre, l'esame polisonnografico effettuato dopo 2 e 4 anni di trattamento è risultato sempre nei limiti della norma con AHI = 4.6. Infine nel paziente MR, la valutazione della funzionalità respiratoria mediante spirometria ha evidenziato alla baseline un quadro restrittivo di grado moderato ( $FEV_1 = 3,73$ ;  $FEV_1/FVC = 80\%$ ). Dopo 4 anni di trattamento, il quadro respiratorio è risultato stazionario. In questo paziente la polisonnografia effettuata a  $T_0$  evidenziava la presenza di 107 apnee ostruttive e un AHI = 15.8, per cui veniva fatta diagnosi di sindrome dell'apnea ostruttiva da sonno di grado lieve. Dopo 5 anni di trattamento enzimatico, è stata ripetuta la polisonnografia che ha evidenziato un significativo miglioramento della funzionalità respiratoria, registrando 12 apnee ostruttive e 3 apnee miste con un totale di 15 apnee e un AHI = 2.4.

### ***Interessamento cardiaco***

Nel paziente CM l'esame ecocardiografico a  $T_{12}$  e a  $T_{18}$  ha mostrato un quadro invariato rispetto a quello registrato al tempo  $T_0$ . Nel paziente CB, dopo 8 mesi di trattamento si è osservato una normalizzazione delle dimensioni del setto interventricolare ( $9 \rightarrow 6.3$  mm; v.n.: 5.5 - 9), mentre l'ispessimento dei lembi valvolari della mitrale e della aorta e l'insufficienza mitralica sono risultati invariati. Nella paziente MC dopo 6 mesi di ERT,

l'esame ecocardiografico ha evidenziato un marcato aumento della pressione sistolica del ventricolo destro; dopo 12 mesi di ERT la paziente ha manifestato dispnea da sforzo e successivamente dispnea ingravescente in condizioni di normale attività fisica ed infine anche a riposo. Per la persistenza di tale sintomatologia la paziente è stata sottoposta ad esame ecocardiografico che ha mostrato una dilatazione biatriale severa, dilatazione del ventricolo destro e l'insufficienza tricuspide, inizialmente lieve, ha subito un peggioramento. È stata, inoltre, rilevata una pressione nell'arteria polmonare sistolica di 100-110 mmHg. La paziente ha presentato, inoltre, dispnea ingravescente che ha richiesto la somministrazione di ossigenoterapia. Conseguentemente l'insufficienza cardiaca ha mostrato un aggravamento passando dalla classe NYHA II alla III. Successivamente, la paziente ha mostrato un progressivo peggioramento dell'insufficienza cardiaca che ne ha determinato l'exitus dopo 16 mesi di ERT. Nel paziente MF, dopo 24 mesi di ERT, la patologia valvolare a carico della valvola mitralica e delle cuspidi aortiche è rimasta del tutto invariata, mentre si è osservato nel tempo un lieve ispessimento delle dimensioni del setto interventricolare (SIV = 10 mm; v.n.: 5.5 – 8.5). La contrattilità cardiaca è risulta nella norma. Nel paziente CR la gravità della valvulopatia non ha subito significative variazioni nel tempo. Nel paziente MR la valutazione cardiologica effettuata al T<sub>0</sub> ha mostrato: ispessimento dei lembi della valvola mitralica ed aortica, insufficienza mitralica lieve-moderata ed insufficienza aortica lieve. Dopo circa 5 anni dall'inizio della terapia si è osservato un lieve peggioramento dell'insufficienza aortica da lieve a moderata, mentre l'insufficienza mitralica è risultata stazionaria nel tempo. Anche l'ispessimento valvolare mitralico ed aortico è risultato stazionario durante il lungo periodo di trattamento. Dopo il secondo anno di trattamento l'esplorazione doppler dei flussi transvalvolari ha evidenziato la presenza di insufficienza tricuspide e polmonare di grado lieve; stenosi mitralica di grado moderato-severo (gradiente medio 10,1 mmHg) e stenosi aortica di

grado moderato (gradiente max 50mmHg, gradiente medio 30 mmHg). Dopo 5 anni di trattamento, tali anomalie sono risultate invariate (**Figura 9 e 10**).

### ***Interessamento articolare***

Nei pazienti IV, DVM, DF, DLI, LS e MC non è stato possibile effettuare alcuna misurazione perché non collaboranti. Nei pazienti CM, CB dopo 12 mesi di ERT, è stato registrato un apprezzabile miglioramento della motilità articolare della spalla (**Figura 11 e 12**). Nel paziente CB, come è possibile notare nella figura 12, mentre il movimento della spalla sia in flessione che in estensione dopo 12 mesi di ERT è risultato significativamente migliorato, in questo stesso paziente, dopo 18 mesi di trattamento enzimatico sostitutivo, si è osservato un significativo peggioramento dell'estensione del gomito. Nei pazienti MF, la motilità articolare, a distanza di circa due anni dall'inizio della ERT è risultata invariata. Anche nel paziente adulto MR, la motilità articolare della spalla sia in flessione che in estensione è risultata stazionaria.

### ***Capacità funzionale***

Il paziente CM a T<sub>0</sub> non è stato in grado di effettuare il “six-minute walking test (6MWT)”. Dopo 13 mesi di ERT è riuscito a percorrere 100 metri in 6 minuti. Nei pazienti CB, CR, MR che presentavano a T<sub>0</sub> una buona capacità funzionale si è osservato nel tempo un progressivo miglioramento della distanza percorsa in sei minuti. Nella paziente IV non è stato possibile effettuare il 6MWT essendo la piccola affetta da tetraparesi. Nei pazienti DVM, DF, DLI e LS il 6MWT non è stato eseguito, in quanto tali pazienti non erano in grado di deambulare in modo autonomo. La paziente DF inoltre presentava una displasia congenita dell'anca. Il paziente MF, a T<sub>0</sub> è riuscito a percorrere per la durata di due minuti 200 metri, e dopo 1 anno di trattamento

è riuscito a percorrere circa 315 metri in 5 minuti. La paziente MC non ha potuto effettuare tale prova per l'estrema affaticabilità (**Figura 13**).

### ***Escrezione urinaria dei GAG***

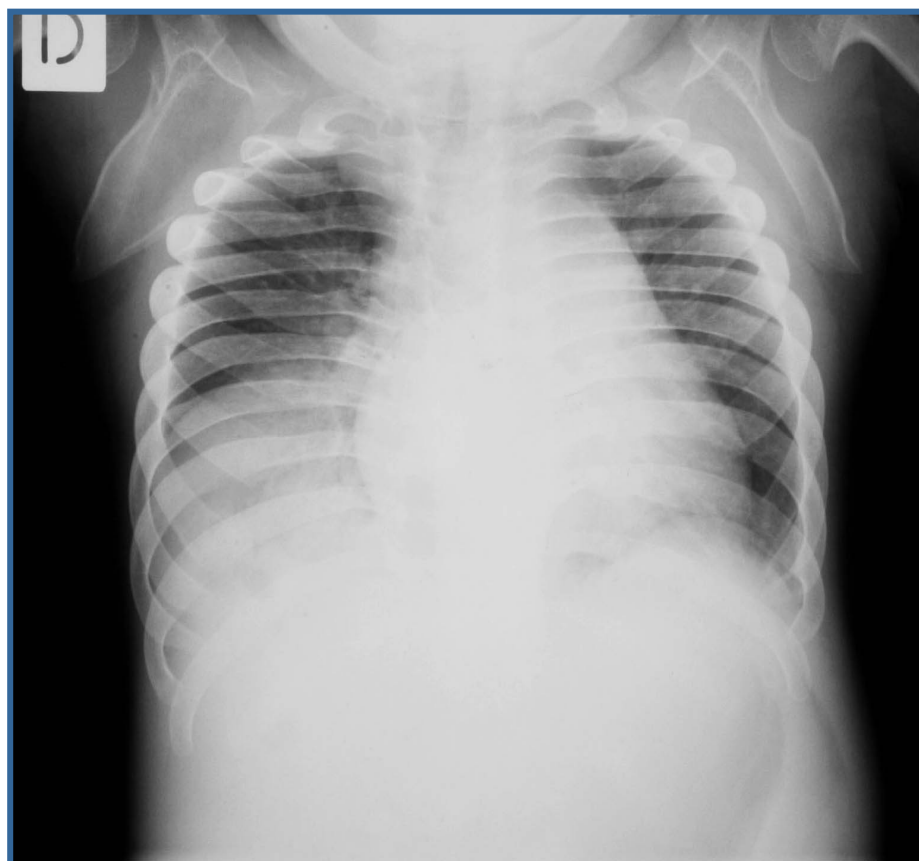
Tutti i pazienti presentavano alla baseline livelli elevati dell'escrezione urinaria dei GAG. I pazienti con fenotipo severo presentavano alla baseline livelli più elevati di GAG. Una riduzione dell'escrezione urinaria dei GAG è stata osservata in tutti i pazienti nei primi 6 mesi di trattamento. Nella 90% dei pazienti si è osservata una riduzione pari a 50% nei primi 6 mesi di trattamento. In un solo paziente (CR), con fenotipo lieve, dopo 6 mesi di trattamento, si è assistito ad una normalizzazione dei livelli dell'escrezione urinaria dei GAG, presentando una riduzione del 90%. In questo paziente, dopo 4 anni di trattamento, si è osservato un lieve incremento dell'escrezione urinaria dei GAG, in quanto il paziente presentava una discreta compliance alla ERT. Nel paziente CB, solo dopo 4 anni di trattamento con laronidasi, il valore dell'escrezione urinaria dei GAG ha raggiunto il range di normalità. Nel paziente MC è stata registrata una riduzione dell'escrezione urinaria dei GAG del 70% e dell'83% rispettivamente dopo 6 e 12 mesi di trattamento. Nel paziente MR dopo 4 settimane di terapia si è registrata una marcata riduzione (circa il 71%) di tale parametro e attualmente risulta lievemente aumentato (57 mg GAG/g creatinina, v.n.  $22 \pm 13$ ) (**Figura 14**).

### ***Epatosplenomegalia***

Nei pazienti da noi trattati non abbiamo registrato sostanziali variazioni della epatosplenomegalia, fatta eccezione per il paziente MR in cui dopo un anno di terapia abbiamo assistito ad una lieve riduzione delle dimensioni della milza e dopo 4 anni di trattamento si è osservato una riduzione delle



dimensioni del fegato (**Figura 15 e 16**). In CM, è stata osservato un lieve incremento del diametro longitudinale del lobo destro del fegato e, dopo circa un anno di terapia, una notevole riduzione dell'ipertrofia dell'ala sinistra del fegato e scomparsa dell'ipertrofia del lobo caudato precedentemente riscontrata. Inoltre nello stesso paziente è stata osservata una lieve riduzione della splenomegalia.



### **Figura 8**

**Complicanza respiratoria nel paziente CM.  
Ernia diaframmatica ed atelettasia da compressione  
del polmone destro.**

	<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>12</sub></b>	<b>T<sub>18</sub></b>	<b>T<sub>24</sub></b>	<b>T<sub>48</sub></b>
<b>CM</b>	Ispess. valv. lieve-moderato (A, M, T) Ispess. del setto di grado moderato Rigurgito M lieve	Ispess. valv. lieve-moderato (A, M, T) Ispess. del setto di grado moderato Rigurgito M lieve	Ispess. valv. lieve-moderato (A, M, T) Ispess. del setto di grado moderato Rigurgito M lieve		
<b>CB</b>	Dilataz. A ascendente, Ispess. valv. (M, A), insuff. M lieve-moderata	Dilataz. A ascendente, Ispess. valv. (M, A), insuff. M lieve-moderato	Dilataz. A ascendente, Ispess. valv. (M, A), insuff. M lieve-moderato	Dilataz. A ascendente, Ispess. valv. (M, A), insuff. M lieve-moderato	Dilataz. A ascendente, Ispess. valv. (M, A), insuff. M lieve-moderato
<b>IV</b>	Ispess. valv. lieve-moderato ( A, M, T) Displasia della valvola mitralica				
<b>MF</b>	Ispess. valv. lieve-moderato ( A, M)	Ispess. valv. lieve-moderato ( A, M)  Insuff. M lieve	Ispessimento di grado lieve del SIV  Ispess. valv. lieve-moderato ( A, M)  Insuff. M lieve		
<b>DVM</b>	Ispess. ventricolo sx lieve, lieve versamento pericardico; apparato valvolare nella norma				
<b>DF</b>	Assenza di anomalie emodinamiche di rilievo				
<b>DLI</b>	Ispess. valv. (M) insuff. M lieve-moderato				

A: Aorta, M: Mitrale, T: Tricuspid; Ins: insufficienza; SIV : setto interventricolare

## Figura 9

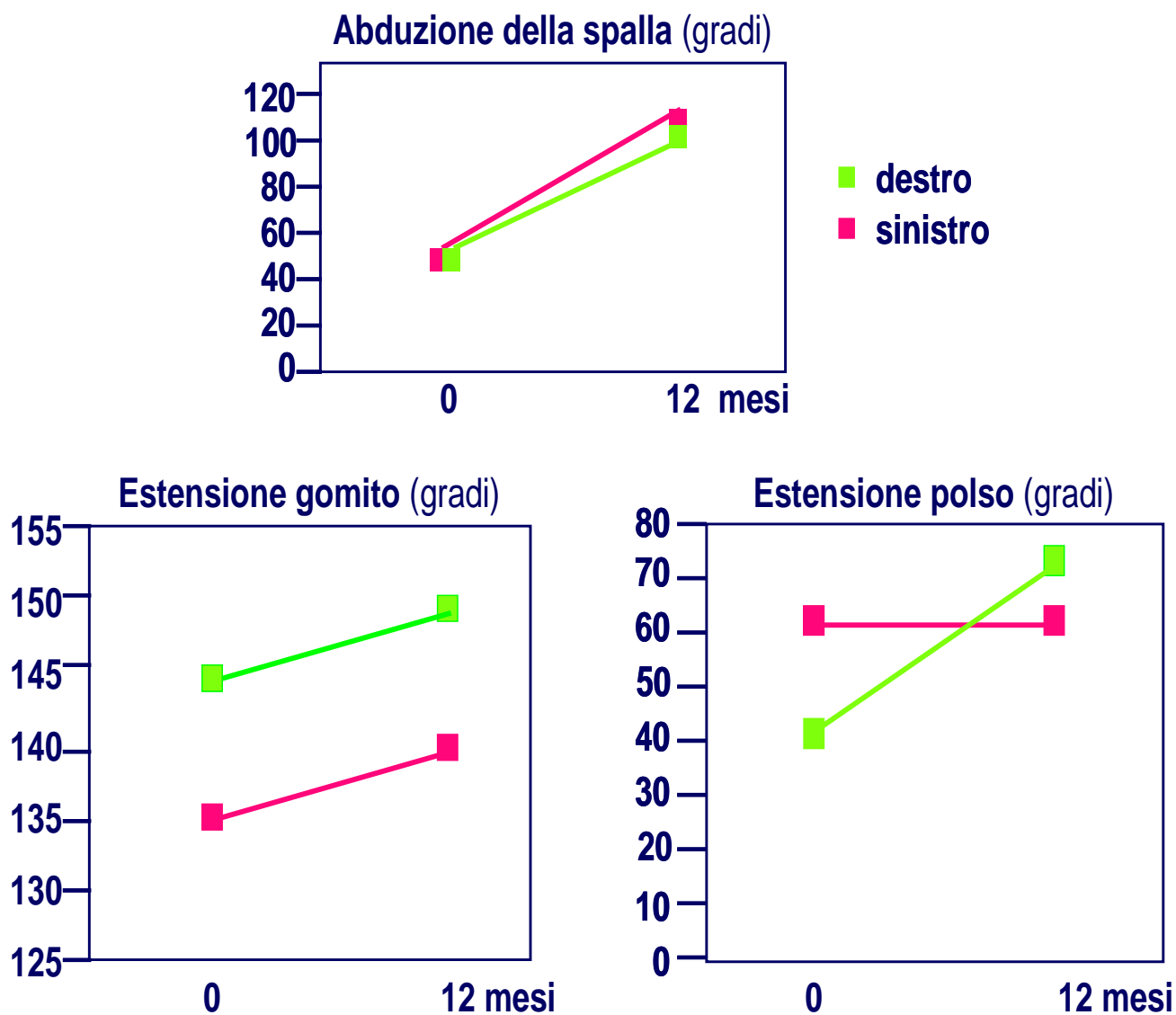
Valutazione cardiologica nei pazienti pediatrici con MPS I

	<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>12</sub></b>	<b>T<sub>18</sub></b>	<b>T<sub>24</sub></b>	<b>T<sub>48</sub></b>
<b>MC</b>	NYHA 2 Insuff. T lieve	NYHA 3 Insuff. T grave			
<b>CR</b>	Ispess. valv. lieve (A, M), insuff. M lieve-moderata, insuff. T e P lieve	Ispess. valv. lieve (A, M), insuff. M lieve-moderata, insuff. T e P lieve	Ispess. valv. lieve (A, M), insuff. M lieve-moderata, insuff. T e P lieve	Ispess. valv. lieve (A, M), insuff. M lieve-moderata, insuff. T e P lieve	Ispess. valv. lieve (A, M), insuff. M lieve-moderata, insuff. T e P lieve
<b>MR</b>	Ispess. valv. (M, A), Ins. M lieve-moderata, Insuff. A lieve	Ispess. Modesto valv. (M, A)  Insuff. M e A lieve – moderata  Insuff. T e P lieve  Stenosi M moderata-severo Stenosi A moderato	Ispess. Modesto valv. (M, A)  Insuff. M e A lieve – moderata  Insuff. T e P lieve  Stenosi M moderata-severo Stenosi A moderato	Ispess. Modesto valv. (M, A)  Insuff. M e A lieve – moderata  Insuff. T e P lieve  Stenosi M moderata-severo Stenosi A moderato	Ispess. Modesto valv. (M, A)  Insuff. M e A lieve – moderata  Insuff. T e P lieve  Stenosi M moderata-severo Stenosi A moderato

**A: Aorta, M: Mitrale, P: Polmonare, T: Tricuspid; Ins: insufficienza**

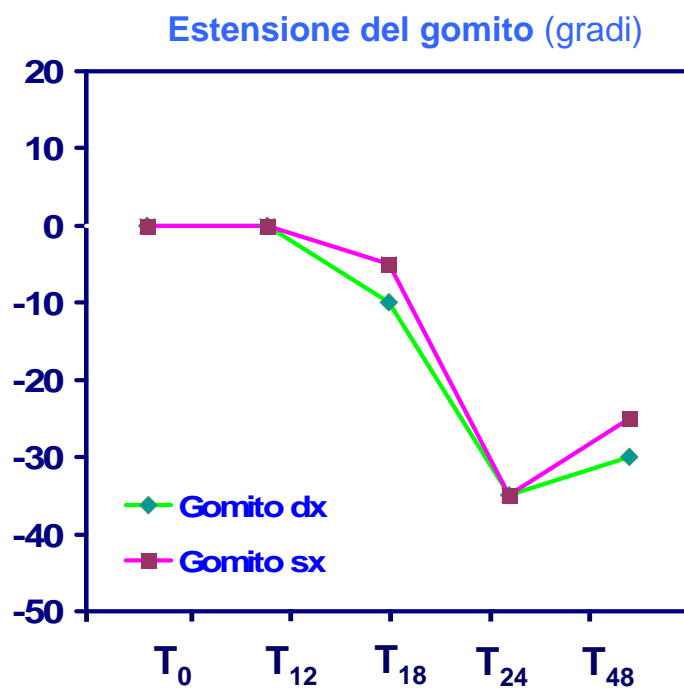
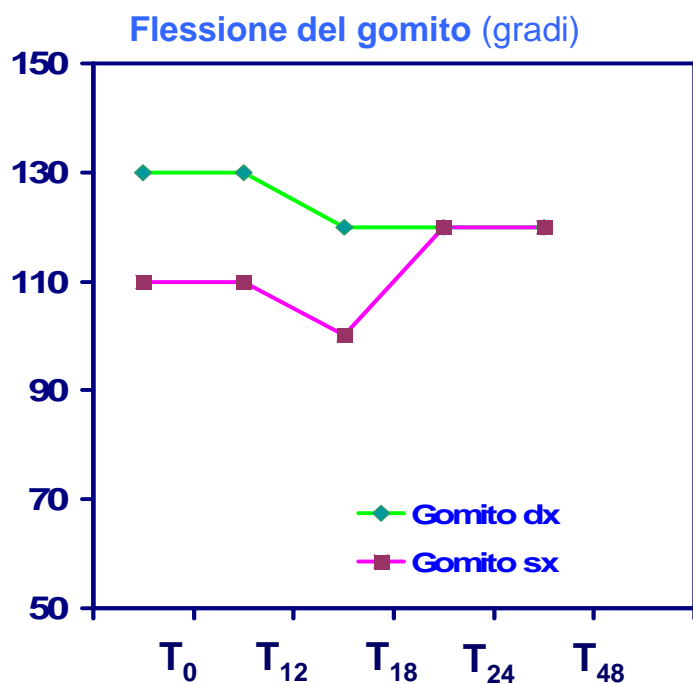
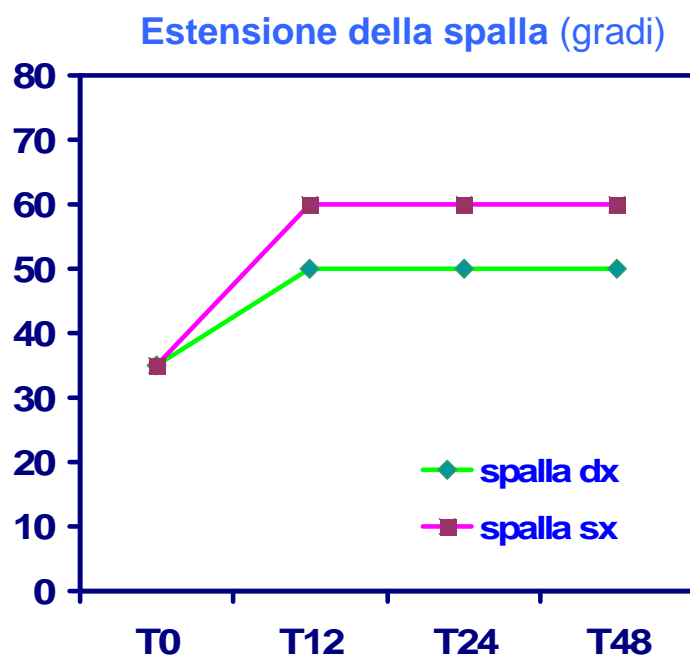
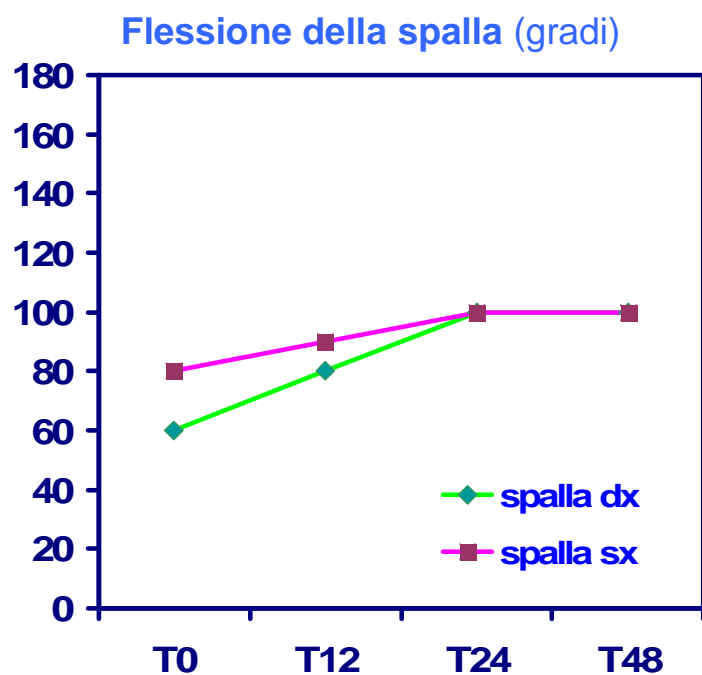
**Figura 10**

Valutazione cardiologica nei pazienti adulti con MPS I



**Figura 11**

VALUTAZIONE MOTILITÀ ARTICOLARE NEL PAZIENTE CM



**Figura 12**

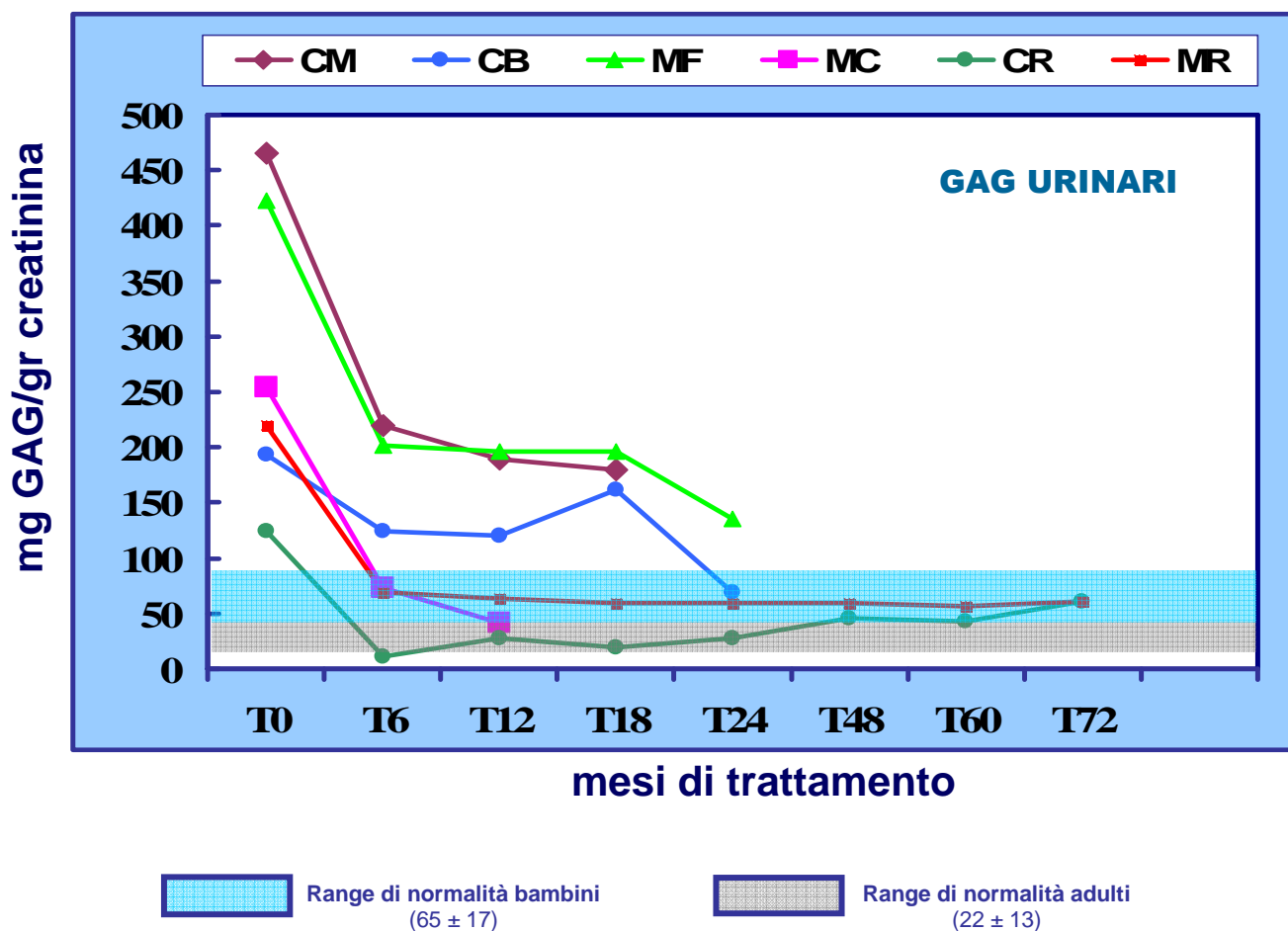
VALUTAZIONE MOTILITÀ ARTICOLARE NEL PAZIENTE CB

	<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>6</sub></b>	<b>T<sub>12</sub></b>	<b>T<sub>24</sub></b>	<b>T<sub>48</sub></b>
<b>CM</b>	np	100			
<b>CB</b>	400	486	550	510	544
<b>IV</b>	np	np			
<b>MF</b>	200*	288*	315**		
<b>DVM</b>	np				
<b>DF</b>	np				
<b>DLI</b>	np				
<b>LS</b>	np				
<b>MC</b>	np	np			
<b>CR</b>	400	400	432	535	572
<b>MR</b>	442	400	400	516	

np : non praticabile; \* Distanza percorsa in due minuti; \*\* Distanza percorsa in cinque minuti

## Figura 13

Distanza percorsa, espressa in metri, valutata mediante il test del cammino dei 6 minuti (6MWT) in pazienti con MPS I



**Figura 14**

Escrezione urinaria dei GAG alla baseline e dopo il trattamento con laronidasi.



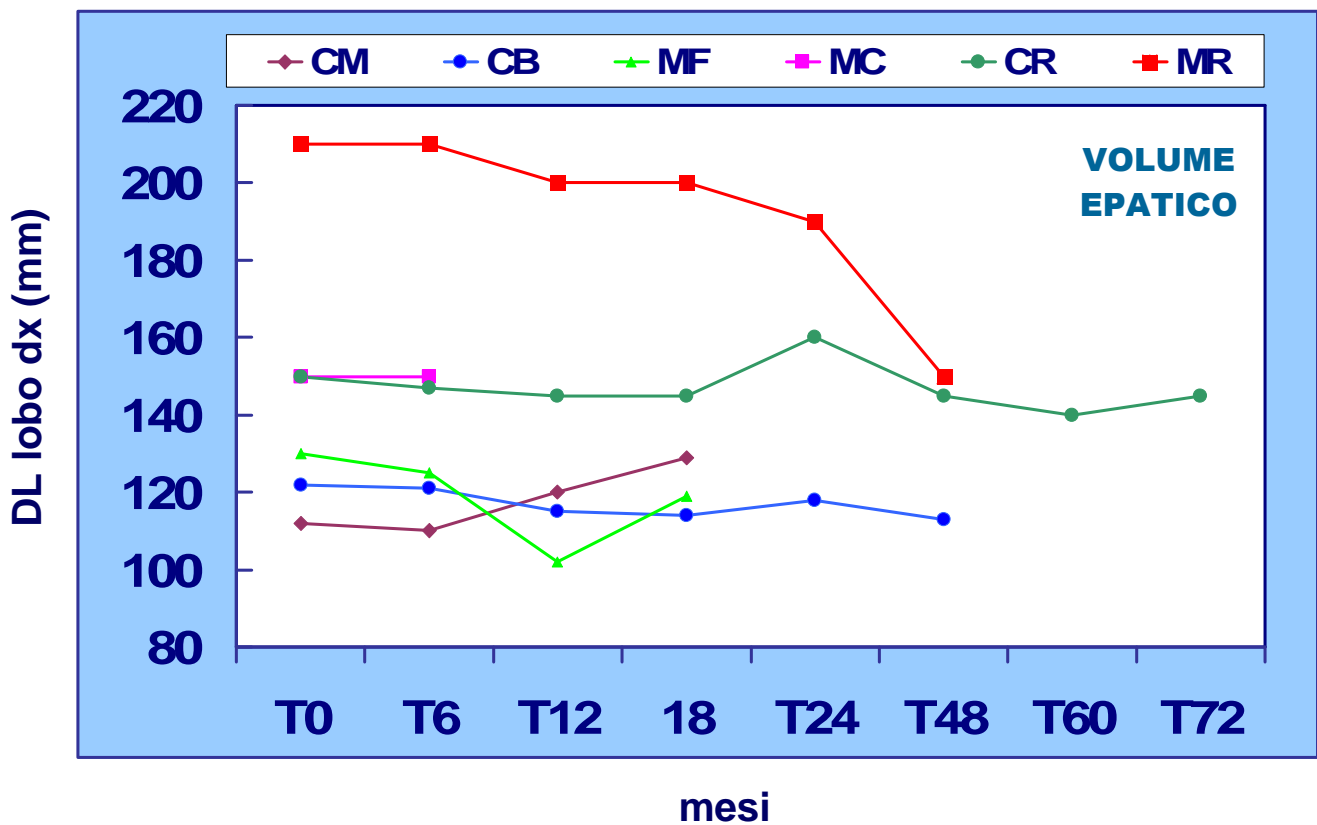


Figura 15

Volume epatico alla baseline e dopo il trattamento con laronidasi.

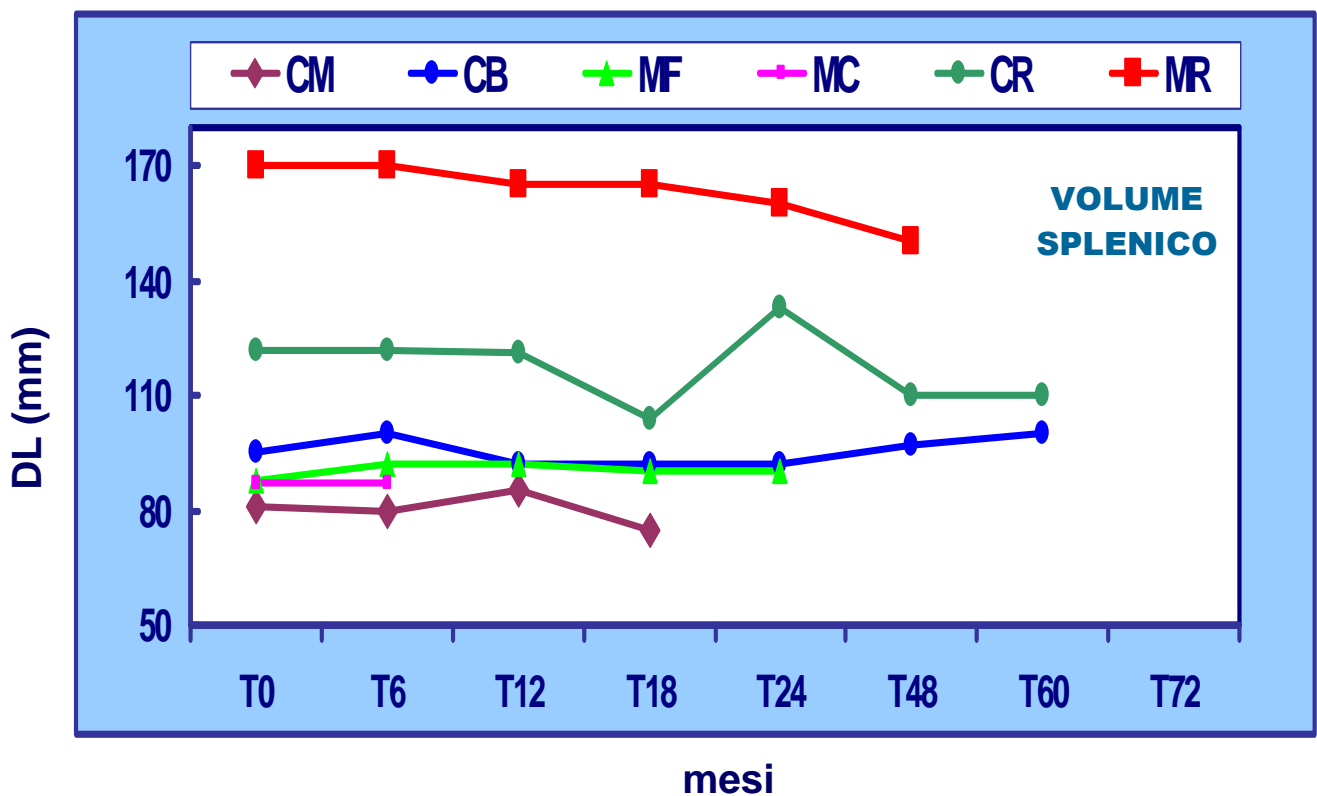


Figura 16

Volume splenico alla baseline e dopo il trattamento con laronidasi.

## 2.9 DISCUSSIONE

La ERT ha determinato un significativo cambiamento nel management dei pazienti affetti da malattie da accumulo lisosomiale; tale approccio terapeutico è stato inizialmente sperimentato nella malattia di Gaucher tipo I e nella malattia di Fabry con risultati molto promettenti tali da indurre i ricercatori ad estenderla anche ad altre malattie da accumulo tra le quali la malattia di Pompe, la malattia di Niemann-Pick di tipo B e le mucopolisaccaridosi tipo I, II, VI. Nel 2003, per i pazienti con MPS I, si è reso disponibile il trattamento enzimatico sostitutivo con enzima ricombinante. I risultati riportati in letteratura sulla ERT nei pazienti con MPS I hanno mostrato una significativa riduzione dell'escrezione urinaria dei GAG, degli episodi di apnea, dell'epatosplenomegalia e un progressivo miglioramento della motilità articolare (Kakkis ED et al., 2001; Wraith JE et al., 2004; Clarke LA et al., 2009). Attualmente non è ancora ben definita l'efficacia della ERT su alcuni organi coinvolti nella MPS I, in alcuni casi anche in modo severo, quali la cornea, il cuore, lo scheletro e il SNC. Di pari importanza è la valutazione della ERT in pazienti affetti da MPS I che presentano manifestazioni cliniche di diversa gravità per poter eventualmente ottimizzare dosi e regimi terapeutici, analogamente a quanto è avvenuto per la malattia di Gaucher. Dai dati disponibili in letteratura, è noto che l'escrezione urinaria dei GAG, l'epatosplenomegalia e le apnee notturne migliorano dopo alcuni mesi dall'inizio della ERT con laronidasi, mentre la motilità articolare e la capacità funzionale del paziente, valutata mediante 6MWT, rispondono alla ERT più lentamente, generalmente almeno dopo un anno di trattamento. Durante il follow-up, conoscere la cronologia di risposta alla ERT dei diversi tessuti rappresenta un aspetto molto importante per poterne valutare l'efficacia. I risultati del nostro studio confermano l'efficacia e la sicurezza a lungo termine della ERT con laronidasi sia tra i pazienti pediatrici che nei pazienti adulti con MPS I su alcune manifestazioni cliniche

della malattia. Il trattamento enzimatico sostitutivo è risultato essere efficace sia nei pazienti con fenotipo severo e sia nei pazienti con forme attenuate della patologia. Tuttavia un aspetto molto importante è che i diversi organi coinvolti nella MPS I rispondono alla ERT in modo differente e anche i tempi di risposta alla terapia sono variabili. In parte la eterogeneità di risposta alla ERT dei diversi sistemi interessati dalla MPS I potrebbe essere legata alla differente capacità di distribuzione dell'enzima nei tessuti. È noto infatti che l'enzima ricombinante sono molecole di grandi dimensioni, che non sono in grado di attraversare liberamente attraverso le membrane cellulari. Inoltre, come è ben noto, l'accumulo dei GAG all'interno dei lisosomi rappresenta sicuramente il *primum movens* nella patogenesi delle manifestazioni cliniche della MPS I. Tuttavia attualmente è noto che l'accumulo intracellulare innesca una serie di reazioni strutturali e biochimiche (quali l'infiammazione, l'alterazione del pathway dell'autofagia, l'innescare di meccanismi pro-apoptotici) che sono alla base dell'inizio e della progressione del danno cellulare e tissutale (Ballabio & Gieselmann, 2009). Pertanto è possibile ipotizzare che la mancata risposta alla ERT in alcuni distretti possa essere legata ai meccanismi patogenetici scatenati dall'accumulo del materiale non degradato. I risultati del nostro studio hanno evidenziato che la risposta alla ERT dei diversi organi coinvolti nella MPS I è molto eterogenea, in quanto abbiamo osservato che alcuni parametri in alcuni pazienti sono progressivamente migliorati, mentre in altri pazienti gli stessi parametri sono rimasti stazionari o sono leggermente peggiorati. Tuttavia, come è ben noto, la MPSI è una patologia eterogenea, multisistemica e progressiva, per cui anche la stabilizzazione o il rallentamento della progressione della malattia in alcuni tessuti mediante ERT può essere considerato come un valido effetto benefico della terapia enzimatica sostitutiva. Nel paziente MF, dopo 24 mesi di ERT, la valutazione neuro-psicologica ha evidenziato un lieve peggioramento del quoziente di sviluppo (QS = 54), con particolare peggioramento nelle aree del linguaggio e del ragionamento pratico. Da segnalare, che in questo paziente, la valutazione audiologica mediante ABR

aveva evidenziato un danno della conduzione lungo la via acustica di tipo neurosensoriale bilaterale e per tale motivo erano state prescritte protesi auricolari, ma la compliance del piccolo all'uso delle protesi è risultata molto scarsa. Pertanto è ipotizzabile che la riduzione del QS osservata in questo paziente potrebbe in parte essere legata alla ipoacusia. Tuttavia, è ben noto che la ERT presenta lo svantaggio di non essere efficace nei pazienti con coinvolgimento neurologico, in quanto l'enzima somministrato non è in grado di superare la barriera ematoencefalica. Dal punto di vista cardiologico i dati disponibili in letteratura non forniscono chiare prove dell'efficacia della ERT. Alcuni dati disponibili in letteratura su pazienti affetti da MPS I con cardiopatia hanno mostrato un miglioramento dell'insufficienza cardiaca variabile da una a due classi NYHA. In alcuni dei soggetti sottoposti ad osservazione è stato evidenziato un miglioramento dell'insufficienza tricuspidale e polmonare; in altri, invece, si è registrato un peggioramento dell'insufficienza mitralica. Nel nostro studio in tutti i pazienti trattati, (pazienti CM, CB, CR e MF) la valvulopatia non ha subito variazioni, in accordo con quanto riportato in letteratura (Wraith JE. 2005); in un paziente (paziente CB) si è osservato una normalizzazione delle dimensioni del setto interventricolare. Invece, nella paziente MC, dopo 12 mesi di ERT, si è manifestato un aggravamento della cardiopatia con peggioramento dell'insufficienza cardiaca fino all'exitus. Dal confronto di queste esperienze emerge la necessità di una rivalutazione della utilità della ERT nel contesto dell'evoluzione delle cardiovalvulopatie, nelle loro varie espressioni. È importante inoltre chiarire se il miglioramento dell'insufficienza cardiaca, valutata secondo la classe NYHA, sia direttamente attribuibile alla terapia o sia conseguenza di un miglioramento del coinvolgimento di altri apparati. Il nostro studio ha inoltre evidenziato l'esigenza di rivalutare l'utilità di questa terapia nei pazienti affetti da MPS I con coinvolgimento respiratorio. Alcuni risultati presenti in letteratura hanno evidenziato un miglioramento di tale aspetto nei pazienti trattati con ERT; tuttavia la nostra esperienza sul paziente CM, di età pediatrica, ha mostrato un incremento degli episodi di apnea e di

manifestazioni infettive a carico delle vie respiratorie. Purtroppo, il paziente è deceduto dopo 18 mesi di terapia per l'insorgenza di un'ernia postero-laterale epatica complicata con atelettasia da compressione del polmone destro (**Figura 8**). Resta da chiarire se tale complicanza sia da attribuire alla malattia di base o se, invece, sia in rapporto alla diminuzione di volume del fegato conseguente alla terapia, favorendone l'erniazione nell'emittoce destro; ciò è importante per trarre un indirizzo utile al trattamento di eventuali casi simili in altri pazienti in trattamento con ERT. Nel paziente MR, la valutazione della funzionalità respiratoria mediante polisonnografia effettuata alla baseline aveva evidenziato la presenza di 107 apnee ostruttive e un AHI = 15.8; dopo 5 anni di trattamento enzimatico, la polisonnografia ha evidenziato un significativo miglioramento della funzionalità respiratoria, registrando 12 apnee ostruttive e 3 apnee miste con un totale di 15 apnee e un AHI = 2.4. I risultati da noi ottenuti sulla motilità articolare in parte si discostano dai dati riportati in letteratura. Infatti mentre nel paziente CB, dopo 12 mesi di ERT, abbiamo osservato un miglioramento della motilità della spalla ma anche un peggioramento significativo del movimento in estensione del gomito (**Figura 12**). La valutazione della capacità funzionale, valutata mediante il 6MWT è progressivamente migliorata in tutti i pazienti trattati. Inoltre, in accordo con quanto descritto in letteratura, in tutti i nostri pazienti si è osservata una riduzione dell'escrezione urinaria dei GAG. Per quanto riguarda la visceromegalia, nei pazienti da noi trattati non abbiamo registrato sostanziali variazioni della epatosplenomegalia, fatta eccezione per il paziente MR in cui dopo un anno di terapia abbiamo osservato una riduzione del 12% delle dimensioni della milza e dopo 4 anni di trattamento si è osservato una riduzione del 30% delle dimensioni del fegato. Nel paziente CM, dopo 18 mesi di terapia, si è verificata una riduzione dell'ipertrofia dell'ala sinistra del fegato e scomparsa dell'ipertrofia del lobo caudato mentre abbiamo riscontrato un lieve aumento del diametro longitudinale del lobo destro. Tale risultato si discosta da quanto registrato in letteratura che riporta invece casi di pazienti nei quali vi è stato un ritorno

alla normale volumetria epatica dopo 26 e 52 settimane di trattamento. Nel paziente CR, durante il lungo periodo di follow-up, abbiamo osservato tra T<sub>12</sub> e T<sub>48</sub> un lieve aumento delle dimensioni del fegato e della milza; durante tale periodo la compliance alla ERT di questo paziente è risulta essere non adeguata. Nel presente studio, degli undici pazienti arruolati, solo in nove pazienti è stato possibile effettuare l'analisi molecolare del gene IDUA. In accordo con i dati disponibili in letteratura, nei pazienti con fenotipo severo la mutazione più frequentemente riscontrata è stata la Q70X, espressa nel 67% dei pazienti. La mutazione W402X, è stata riscontrata in una sola paziente (paziente IV) con fenotipo severo. Tra i nostri pazienti adulti, il paziente CR portatore del genotipo [974ins12 ] + [ P496R], a differenza di quanto riportato da Beesley CE et al, è stato classificato come fenotipo attenuato (Beesley CE et al., 2001). Terlato NJ et al, riportarono che i pazienti portatori della mutazione missense R89Q risultavano in generale presentare un fenotipo clinico più lieve (Terlato NJ et al., 2003). Anche nella nostra esperienza, la mutazione R89Q è stata identificata, allo stato di omozigosi, in un paziente con fenotipo Scheie (paziente MR). In conclusione, l'esperienza internazionale sull'efficacia della ERT nella MPS I è ancora limitata. Per questo motivo la nostra esperienza, anche se basata su pochi pazienti, rappresenta un valido contributo alla valutazione dell'efficacia di questo approccio terapeutico. I risultati del nostro studio dimostrano che il trattamento con  $\alpha$ -L-iduronidasi ricombinante può ridurre l'accumulo lisosomiale dei GAG e migliorare alcuni degli aspetti clinici della MPS I. La disponibilità di un trattamento efficace e ben tollerato rende più che mai indispensabile una diagnosi precoce, al fine di prevenire o quantomeno cercare di ritardare la progressione della malattia e ottimizzare gli effetti benefici della ERT con rhIDUA. Tuttavia dati i limiti della ERT su alcuni aspetti della MPS I, quali il sistema nervoso centrale, il cuore, il sistema scheletrico e il tessuto cartilagineo, ulteriori strategie terapeutiche sono auspicabili per poter trattare le differenti manifestazioni cliniche della MPS I.

## 2.10 BIBLIOGRAFIA

Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1793(4):684-96. Epub 2008 Dec 8. Review.

Beck M. Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life*. 2010 Jan;62(1):33-40. Review.

Beesley CE, Meaney CA, Greenland G, Adams V, Vellodi A, Young EP, Winchester BG. Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations. *Hum Genet*. 2001 Nov;109(5):503-11. Epub 2001 Oct 19.

Boelens JJ, Prasad VK, Tolar J, Wynn RF, Peters C. Current International perspectives on hematopoietic stem cell transplantation for inherited metabolic disorders. *Pediatr Clin N Am*. 2010 Feb;57:123-145.

Clarke LA, Wraith JE, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Sidman M, Kakkis ED, Cox GF. Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics*. 2009 Jan;123(1):229-40.

Desnick RJ, Schuchman EH. Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nature Review Genetic* 2002 Dec; 3 (12) : 954-66.

Gabrielli O, Clarke LA, Bruni S, Coppa GV. Enzyme-replacement therapy in a 5-month-old boy with attenuated presymptomatic MPS I: 5-year follow-up. *Pediatrics*. 2010 Jan;125(1):e183-7. Epub 2009 Dec 21.

Gatti R, Di Natale P, Villani GR, Filocamo M, Muller V, Guo XH, Nelson PV, Scott HS, Hopwood JJ. Related Mutations among Italian mucopolysaccharidosis type I patients. *J Inherit Metab Dis*. 1997 20(6):803-6

Guffon et al. Follow-up of nine patients with Hurler Syndrome after bone marrow transplantation. *J Pediatr* 1998;133: 119-25

Hall CW, Liebaers I, Di Natale P, Neufeld EF. Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. *Methods Enzymol* 1978; 50: 439

Kakkis ED, Matynia A, Jonas AJ, Neufeld EF. Overexpression of the human lysosomal enzyme  $\alpha$ -L-iduronidase in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif* 1994; 5: 225 – 32

Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Philips J, Doroshov R, Walot I, Hoft R, Neufeld EF. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* 2001; 344 (3): 182-8

Muenzer J, Wraith JE, Clarke LA. International Consensus Panel on Management and Treatment of Mucopolysaccharidosis I. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines. *Pediatrics*. 2009 Jan;123(1):19-29.

Myer CM. Airway obstruction in Hurler's syndrome--radiographic features. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1991 Jul;22(1):91-6.

Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, et al, editors. *The*



metabolic and molecular bases of inherited disease. 8<sup>th</sup> ed. New york, NY: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2001. p. 3421

Nicolson SC, Black AE, Kraras CM. Management of a difficult airway in a patient with Hurler-Scheie Syndrome during cardiac surgery. *Anesth Analg* 1992;75: 830-2

Peters C, Balthazor M, shapiro EG, King RJ, Kollman C, Hegland JD, et al. Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler syndrome. *Blood* 1996; 87: 4894 - 902.

Peters ME, Arya S, Langer LO, Gilbert EF, Carlson R, Adkins W. Narrow trachea in mucopolysaccharidoses. *Pediatr Radiol*. 1985;15(4):225-8.

Scott HS, Ashton LJ, Eyre HJ, Baker E, Brooks DA, Callen DF, et al. Chromosomal localization of the alpha-L-iduronidase gene (IDUA) to 4p16.3 *Am J Hum Genet* 1990; 47: 802-7

Scott HS, Gui XH, Hopwood JJ, Morris CP. Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene (IDUA) that cause Hurler and Scheie syndromes. *Genomics* 1992, 13: 1311-3

Shapiro J, Strome M, Crocker AC. Airway obstruction and sleep apnea in Hurler and Hunter syndromes. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1985 Sep-Oct;94(5 Pt 1):458-61.

Shull RM, Kakkis ED, McEntee MF, Kania SA, Jonas AJ, Neufeld EF. Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 : 12937- 41

Sly WS. Enzyme replacement therapy: from concept to clinical practice. *Acta Paediatr. Suppl* 2002; 91 (439) 71-78.

Stephan MJ, Stevens EL, Jr, Wenstrup RJ, Greenberg Cr, Gritter HI, Hodges GF, Guller B. Mucopolysaccharidosis I presenting with endocardial fibroelastosis of infancy. *Am J Dis Child* 1989; 143; 782-4

Terlato NJ, Cox GF. Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature. *Genet Med*. 2003 Jul-Aug;5(4):286-94.

Whitley CB, Belani KG, Chang PN, et al. Longterm outcome of Hurler syndrome following bone marrow transplantation. *Am J Med Genet* 1993; 46: 209 -18

Wraith JE. The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. *Arch Dis Child* 1995; 72: 263

Wraith JE. The first 5 years of clinical experience with laronidase enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I. *Expert Opin. Pharmacother* 2005 6 (3): 489 – 506

Wraith JE, Clarke LA, Beck M, Kolodny EH, Pastore GM, et al. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: A randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant Human  $\alpha$ -L-iduronidase (Laronidase) *The Journal of Pediatrics*, May 2004 144 (5): 581-88

## **APPENDICE DEL PROGETTO 1**

## **Progressi terapeutici nelle malattie rare: l'esempio della Mucopolisaccaridosi di tipo I**

*(articolo in press)*

**Generoso Andria, *Napoli***  
**Maurizio Caniglia, *Roma***  
**Mario Castorina, *Roma***  
**Giovanni Valentino Coppa, *Ancona***  
**Maja Di Rocco, *Genova***  
**Carlo Dionisi Vici, *Roma***  
**Orazio Gabrielli, *Ancona***  
**Edoardo Lanino, *Genova***  
**Chiara Messina, *Padova***  
**Francesco Papadia, *Bari***  
**Rossella Parini, *Monza (MI)***  
**Attilio Rovelli, *Monza (MI)***  
**Maurizio Scarpa, *Padova***  
**Michelina Sibilio, *Napoli***  
**Marco Spada, *Torino***

### **PREMESSA**

#### **Perché un documento monografico sulla Mucopolisaccaridosi I per il Pediatra?**

La domanda sorge spontanea ed è appropriata. La risposta è essenzialmente correlata alle più recenti acquisizioni scientifiche che non solo hanno consentito di comprendere meglio i complessi meccanismi patogenetici che stanno alla base del variegato quadro clinico di questa affezione, ma hanno anche messo in evidenza l'efficacia di interventi terapeutici specifici che, se applicati tempestivamente, sono in grado di modificare significativamente la storia naturale della malattia. Da qui l'importanza che il Pediatra abbia le basi per riconoscere precocemente i segni clinici di sospetto, sia aggiornato sulle procedure diagnostiche attualmente disponibili e sia informato sulla ubicazione dei centri specializzati di riferimento. Un ritardo nella diagnosi comporta un significativo peggioramento della prognosi in quanto i danni, una volta instaurati, sono irreversibili.

Quanto riportato in questa sede riguardo alla Mucopolisaccaridosi I rappresenta un modello di approccio alle altre malattie da accumulo lisosomiale, con particolare riferimento a quelle per le quali esistono possibilità terapeutiche. Il Pediatra, infatti, sta realizzando come sia sempre più probabile per lui trovarsi di fronte a malattie rare.

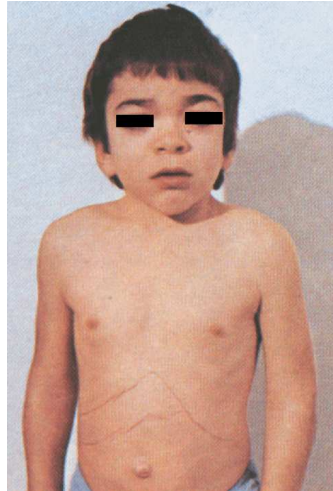
## 1. INTRODUZIONE

La Mucopolisaccaridosi tipo I (MPS I) è una delle forme più frequenti nell'ambito delle malattie da accumulo lisosomiale (1 caso/60.000 nati), si trasmette con meccanismo autosomico recessivo, e si caratterizza per l'ampio spettro delle manifestazioni cliniche. Essa è dovuta al deficit di  $\alpha$ -L-iduronidasi, enzima lisosomiale preposto alla degradazione del dermatan solfato e dell'eparan solfato, due glicosaminoglicani (GAG) fondamentali per le funzioni di supporto del tessuto connettivo, delle cartilagini articolari e delle valvole cardiache, nonché importanti mediatori della regolazione e della comunicazione cellulare. L'accumulo dei GAG nei lisosomi, che sono presenti in tutte le cellule dell'organismo fatta eccezione per i globuli rossi, è responsabile di una generalizzata e progressiva disfunzione cellulare che si traduce, sul piano clinico, in una sintomatologia progressivamente ingravescente a carico di vari organi ed apparati: respiratorio, cardiocircolatorio, scheletrico, oculare e, nelle forme più gravi, anche del sistema nervoso centrale.

La MPS I era classicamente suddivisa in tre forme cliniche distinte, singolarmente più rare, denominate rispettivamente sindrome di Hurler, Hurler-Scheie e Scheie, sulla base della decrescente gravità. Attualmente, in seguito al difficile inquadramento di diversi pazienti per l'ampia variabilità dell'espressione clinica, è raccomandata la classificazione della MPS I in una "forma grave" ad esordio precoce ed associata a grave ritardo psicomotorio ed una "forma attenuata", ad esordio più tardivo, in cui il ritardo psicomotorio è lieve o del tutto assente.

## 2. SEGNI CLINICI ED ELEMENTI DI SOSPETTO

### 2.1 Lo spettro clinico della MPS I



**FORMA GRAVE**

**FORMA ATTENUATA**

#### Aspetti clinici salienti

##### HURLER

- Lineamenti grossolani marcati del volto
- Grave e progressivo deterioramento intellettivo e cognitivo
- Idrocefalo
- Epatosplenomegalia
- Opacità corneale precoce
- Broncopatia ostruttiva
- Miocardiopatia e valvulopatia
- Limitazioni articolari
- Gravi anomalie scheletriche
- Exitus entro la prima decade di vita

##### HURLER/SCHEIE

- Lineamenti grossolani del volto
- Ritardo psicomotorio lieve o assente
- Epatosplenomegalia
- Opacità corneale
- Apnee notturne
- Valvulopatia
- Limitazioni articolari
- Exitus nell'adolescenza o nell'età adulta

##### SCHEIE

- Assenza di lineamenti grossolani del volto
- Performance intellettive normali
- Opacità corneale tardiva
- Broncopatia ostruttiva tardiva e/o apnee notturne
- Valvulopatia
- Sindrome del tunnel carpale e rigidità articolare
- Normale aspettativa di vita

## 2.2 Segni di allarme della MPS I

- Presenza e modificazione dei **lineamenti del volto** che assumono con il tempo **tratti** sempre piu' **grossolani**
- Comparsa di **epato-splenomegalia**
- Osservazione precoce di un **gibbo** a livello lombare
- **Macrocrania**
- **Corizza** mucopurulenta e **flogosi** recidivanti delle **prime vie aeree**
- Lieve **opacita' corneale**
- Presenza di **ernie inguinali e/o ombelicali**
- Presenza di **linfociti vacuolati** su striscio di sangue periferico



Gibbo dorso-lombare in bambino con MPS I grave di 5 anni



Ernia ombelicale in bambina con MPS I grave di 2 anni

## 2.3 Storia naturale della malattia

La storia naturale della MPS I si diversifica nelle varie forme sia per l'epoca di insorgenza, che per la differente rapidità di evoluzione, per la variabilità del fenotipo, nonché per l'età di sopravvivenza; da ciò consegue una specificità dei protocolli assistenziali.

### FORMA GRAVE - MPS-OSI I/H (SINDROME DI HURLER)

#### L'evoluzione della malattia



12 mesi



22 mesi



39 mesi

La MPS I/H (S. di Hurler), pur rappresentando il prototipo di questo gruppo di affezioni, non è la più frequente (1/144.000).

#### 6 MESI

Usualmente i primi segni clinici sono evidenti intorno ai SEI MESI DI VITA. Il dato più caratteristico a questa età è costituito dalla **cifosi toraco-lombare (gibbo)**. Una radiografia dello scheletro permette di rilevare **segni di disostosi** già a questa età. Le **ernie** ed una **modesta epatosplenomegalia** sono anche rilevabili nel PRIMO ANNO di vita. Lo sviluppo psicomotorio a questa età è nella norma.

#### 12-24 MESI

Nel SECONDO ANNO di vita i **lineamenti del volto** diventano **sempre più marcati**, incomincia a manifestarsi un **ritardo psicomotorio**, l'**epatosplenomegalia** è **marcata**, la **cute si ispessisce**, compaiono le prime **limitazioni alle grandi articolazioni**. Già a questa età l'instabilità atlanto-occipitale, che è parte delle alterazioni scheletriche, può determinare una compressione midollare che potrebbe esitare, negli anni successivi, in una tetraparesi.

#### 24-36 MESI

Il quadro clinico evolve ulteriormente TRA IL SECONDO ED IL TERZO ANNO, periodo in cui la facies assume il caratteristico aspetto "a mascherone di fontana" con **sopracciglia marcate**, **peluria diffusa al volto**, **radice del naso infossata**, **narici larghe ed anteverse** con corizza costante mucopurulenta, **labbra ispessite**, **macro glossia** e **ipertrofia gengivale**.

In alcuni pazienti l'accumulo di GAG a **livello cerebrale** può determinare turbe della circolazione liquorale con possibile sviluppo di idrocefalo, che può

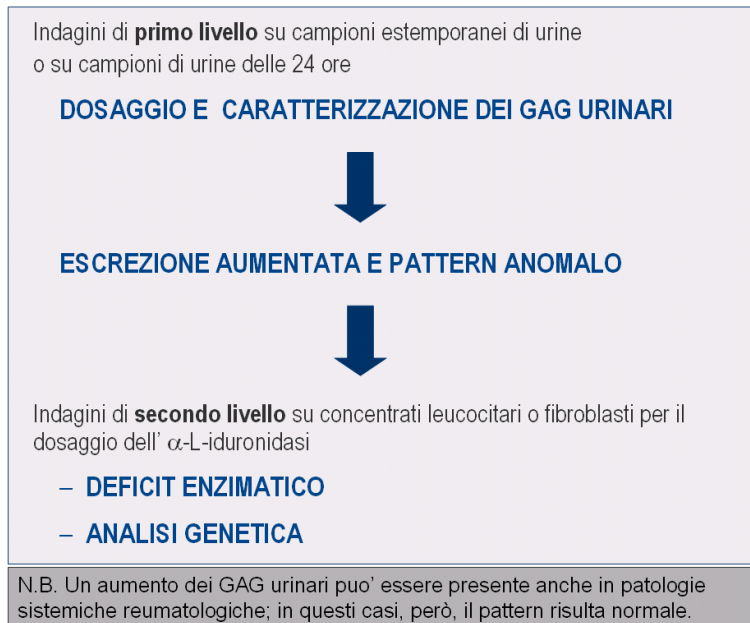


istaurarsi insidiosamente senza segni clinici conclamati di ipertensione endocranica. A **carico dell'occhio** è presente opacità corneale evidenziabile alla lampada a fessura, ma visibile anche ad occhio nudo nelle fasi più avanzate della malattia; per di più in alcuni casi è possibile il verificarsi di un glaucoma. Anche la **funzione uditiva** si riduce col tempo. Il **torace** si deforma per la comparsa di una cifosi dorso-lombare progressivamente ingravescente; **l'addome** è voluminoso, protrudente per la notevole epatomegalia e per l'ipotonia delle pareti addominali. La **respirazione** diventa sempre più rumorosa anche per la frequente ipertrofia adenotonsillare ed alcuni pazienti vanno incontro a crisi di apnea nel sonno. Col tempo si possono evidenziare **soffi cardiaci** dovuti all'accumulo di GAG a livello dei lembi valvolari; occasionalmente si possono avere anche **restringimenti coronarici**, veri o relativi rispetto alla ipertrofia cardiaca, che determinano crisi di angina, difficilmente diagnosticabili, data la situazione psichica dei pazienti. La **motilità articolare** si riduce progressivamente, determinando atteggiamenti in semiflessione degli arti, mentre le **mani** assumono il caratteristico aspetto "ad artiglio" e la **crescita staturale** si riduce notevolmente. L'insieme delle **anomalie scheletriche** configura il quadro radiologico della "disostosi multipla", presente con differente espressività in tutte le forme di MPS I.

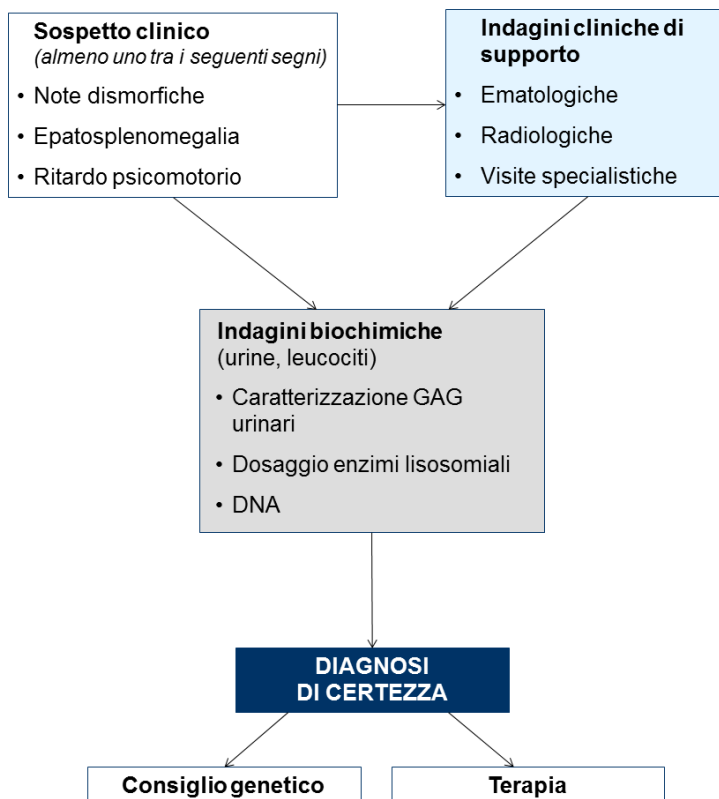


### 3. DIAGNOSI DI LABORATORIO

#### 3.1 Indagini di laboratorio per la diagnosi di MPS I



#### 3.2 Iter diagnostico della MPS I



## 4. TRATTAMENTO

Pressoché tutti i pazienti affetti da MPS I sono attualmente trattati con trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) o con terapia enzimatica sostitutiva (TES). La decisione di trattare in un modo o nell'altro è basata sulla possibilità che ha il paziente di sviluppare in futuro deterioramento delle funzioni intellettive e cognitive (la TES non passa la barriera ematoencefalica) e sulla età e presenza o assenza di ritardo psicomotorio al momento della prima valutazione. Si tende a non trapiantare bambini con un quoziente di sviluppo inferiore o uguale a 70 valutato alla scala Griffiths al momento della prima visita.

### 4.1 Trattamento specifico

#### 4.1.1 Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche

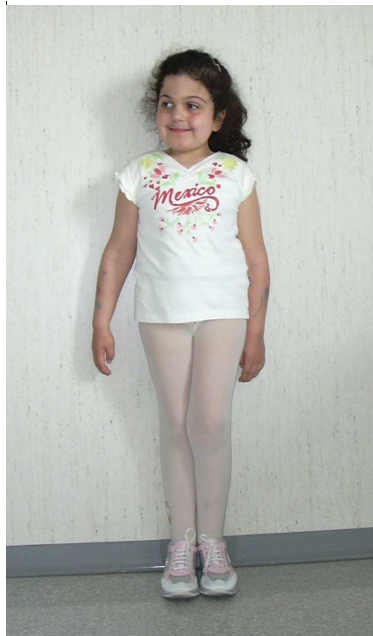
Per trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) si intende una procedura finalizzata al trapianto di cellule derivate dal midollo osseo, dal sangue periferico o dal cordone ombelicale di donatori familiari o non familiari risultati sufficientemente compatibili. Il razionale risiede nel fatto che il trapianto può ripopolare alcuni compartimenti del ricevente con cellule metabolicamente normali, in particolare può sostituire parte della microglia nel sistema nervoso centrale. Dopo il trapianto, l'enzima normale viene rilasciato dalle cellule derivate dal donatore e viene captato e introdotto nelle cellule difettive del ricevente, dove degrada i GAG urinari. Il TCSE è il trattamento indicato nella forma grave di MPS I proprio perché, a differenza della terapia enzimatica sostitutiva, è in grado di modificare significativamente l'evoluzione del danno neurologico associato alla malattia. La terapia enzimatica sostitutiva viene comunque associata al trapianto e, in genere, viene somministrata dalla diagnosi sino a quando, con l'attecchimento del trapianto, viene documentata una stabile produzione endogena dell'enzima.

Per prevenire efficacemente il deterioramento delle funzioni mentali, il trapianto deve essere eseguito quanto prima possibile (meglio se entro i primi 12 mesi di vita). Gli indirizzi dei centri trapianto italiani sono reperibili sul sito [www.aieop.org](http://www.aieop.org). Negli ultimi anni, il TCSE è diventato una procedura molto più sicura che in passato, con una sopravvivenza superiore al 90%. Dopo il trapianto, per un periodo variabile, ma in genere di 6-12 mesi, il ricevente deve assumere una terapia immunosoppressiva. L'attecchimento del trapianto porta ad una rapida riduzione del substrato accumulato in diversi tessuti ed organi. Il miglioramento o la stabilizzazione della malattia a livello del sistema nervoso centrale può richiedere tempi più lunghi poiché l'ingresso delle cellule derivate dal donatore in tale sede è un fenomeno più lento. Il trapianto ha un impatto non sufficiente sull'interessamento scheletrico della malattia e, negli anni successivi, possono essere necessari diversi interventi ortopedici. Oggi, con l'uso del cordone ombelicale, il rischio di rigetto si è estremamente ridotto; sino a pochi anni fa, circa un terzo dei pazienti presentava rigetto e doveva essere sottoposto ad un secondo trapianto.

La terapia genica, oggi in sperimentazione per altre malattie rare, potrebbe essere a breve una prospettiva di ricerca clinica anche per la MPS I.



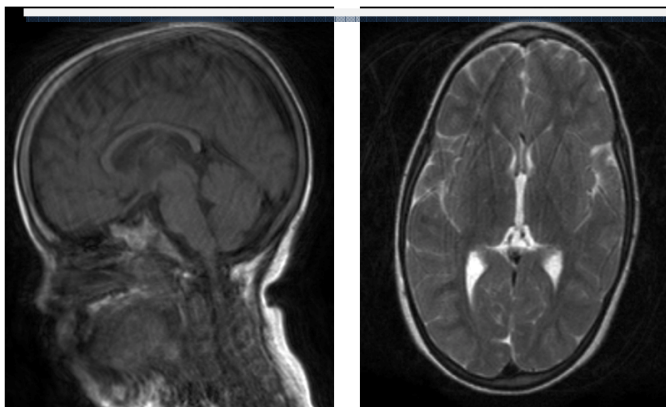
Bambino con MPS I grave, non trattato, a 8 anni d'età



Bambina con MPS I grave, a 8 anni d'età, a 6 anni dal trapianto

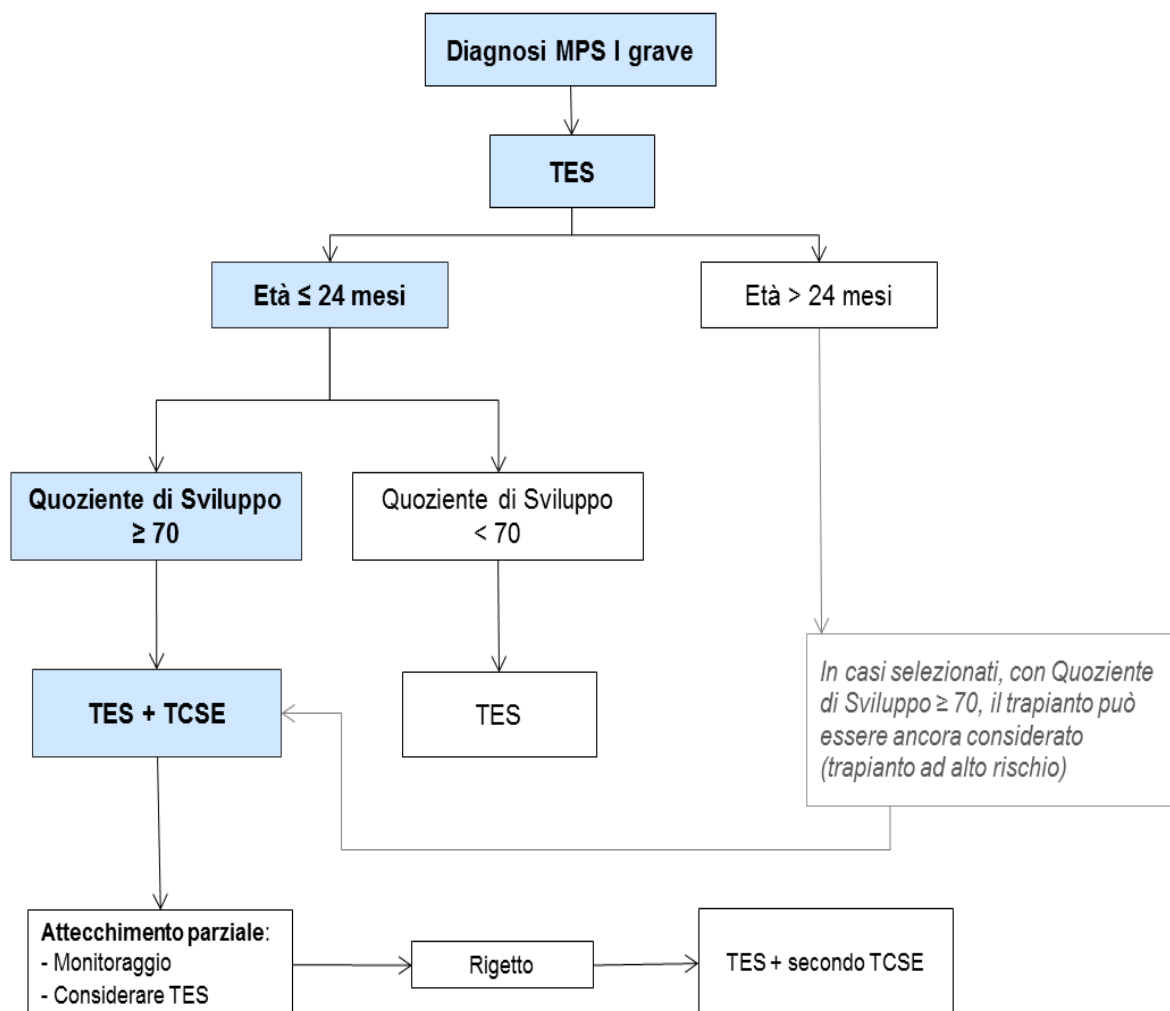


RMN cerebrale di un bambino con MPS I grave, non trattato



RMN cerebrale di un bambino con MPS I grave, a 6 anni e 9 mesi d'età, 1 anno e 2 mesi dal trapianto

**Algoritmo di trattamento per i pazienti con diagnosi di MPS I.**  
(Figura modificata da Muenzer J et al., Pediatrics. 2009 ).



#### 4.1.2 La terapia enzimatica sostitutiva (TES)

Negli anni si è cercato di affrontare con varie strategie terapeutiche i numerosi aspetti del quadro clinico della MPS I. Dal 2001, tra le nuove proposte terapeutiche per la gestione dei pazienti affetti da MPS I, si è aggiunta la terapia enzimatica sostitutiva (TES) con  $\alpha$ -L-iduronidasi ricombinante (rhIDUA), alla dose di 100U/kg a settimana (0.58 mg/Kg/settimana). La TES è basata sull'infusione per via endovenosa dell'enzima lisosomiale ricombinante. L'enzima successivamente viene internalizzato dalle cellule del paziente e indirizzato, attraverso la via del mannosio-6-fosfato, verso i lisosomi dove esercita la sua attività. La somministrazione della TES, che dura alcune ore, deve essere effettuata una volta a settimana.

La TES, nei soggetti non trapiantati, deve essere proseguita per tutta la vita. In alcuni pazienti, in particolare nei pazienti pediatrici, risulta difficile, se non impossibile, stressante e doloroso il reperimento dell'accesso venoso periferico; in questi casi, è possibile posizionare un catetere venoso centrale (CVC) a lungo termine.

Le sperimentazioni cliniche con rhIDUA in pazienti affetti da MPS I hanno evidenziato nel tempo risultati molto promettenti e hanno confermato l'efficacia della TES. In particolare gli studi finora condotti hanno dimostrato che la TES è in grado di ridurre in modo significativo l'escrezione urinaria di GAG, le dimensioni del fegato e della milza, e di migliorare la funzionalità respiratoria (riduzione del numero di apnee notturne), la capacità vitale, il test del cammino dei 6 minuti e la qualità di vita. In tutti i pazienti è stato riscontrato un miglioramento variabile della motilità articolare. Non sono stati osservati miglioramenti dell'opacità corneale e delle alterazioni scheletriche preesistenti. Per quanto riguarda l'efficacia della TES sulle manifestazioni cardiovascolari, è noto attualmente che la TES migliora l'ipertrofia ventricolare sinistra, ma sembra avere scarso effetto sulle anomalie valvolari.

Con la TES non sono state osservate modifiche significative della sintomatologia a carico del sistema nervoso centrale, poiché l'enzima ricombinante, essendo una macromolecola proteica, non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica; pertanto la TES non è efficace nei pazienti con coinvolgimento neurologico.

Attualmente è noto, così come per le altre malattie lisosomiali per le quali è disponibile la TES (es. Malattia di Pompe, Mucopolisaccaridosi tipo II, VI etc.), che i diversi organi coinvolti nella MPS I rispondono in modo differente alla TES e anche i tempi di risposta sono differenti (es. 3 mesi per i GAG, 12 mesi per la visceromegalia). La variabilità di risposta al trattamento potrebbe essere correlata alla differente capacità di distribuzione dell'enzima ricombinante nei diversi tessuti coinvolti e all'età in cui viene iniziato il trattamento. Infatti, l'esperienza riportata da Gabrielli et al. sembra suggerire che l'inizio precoce della TES, in particolare per le forme attenuate, possa significativamente ritardare o addirittura prevenire l'insorgenza dei segni clinici maggiori della MPS I, modificando in tal modo la storia naturale della malattia.

I risultati riscontrati in letteratura hanno mostrato che il trattamento enzimatico con rhIDUA è ben tollerato sia nei bambini che negli adulti. Tra gli effetti collaterali rilevati, le reazioni di ipersensibilità al farmaco sono le più frequenti e comprendono febbre, reazioni cutanee in corrispondenza del sito di iniezione, rash, artralgie, cefalea, orticaria ricorrente, dolore addominale, brividi; tali reazioni, di semplice gestione, diminuiscono nel tempo. Dai dati riportati in letteratura, risulta che il 93% dei pazienti trattati con rhIDUA sviluppa anticorpi anti-enzima della classe IgG; tuttavia, tali anticorpi non sembrano limitare l'efficacia e la sicurezza della TES.

Nel 2009 sono state pubblicate le linee guida internazionali per un adeguato management dei pazienti con MPS I. In conclusione, la disponibilità di un trattamento efficace e ben tollerato rende più che mai **indispensabile una diagnosi precoce**, al fine di prevenire o quantomeno cercare di ritardare la progressione della malattia e ottimizzare gli effetti benefici della TES con rhIDUA.

#### 4.1.3 Risultati attesi del trattamento

TABELLA 1 - Risultati attesi del trattamento

	Trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE)	Terapia enzimatica sostitutiva (TES)
<b>GAG urinari</b>	Normalizzazione dopo attecchimento	Riduzione a valori normali o poco superiori alla norma nel primo anno e stabilizzazione
<b>Attività enzimatica leucocitaria endogena</b>	Normalizzazione dopo attecchimento	Non modificata
<b>Epatosplenomegalia</b>	Normalizzazione nella maggior parte dei casi	Riduzione volume organi nel primo e secondo anno e poi stabilizzazione
<b>Funzione respiratoria</b>	Dati non disponibili	Migliora o stabilizza nel 75% dei casi circa
<b>Infezioni respiratorie</b>	Riduzione frequenza e gravità	Riduzione frequenza e gravità
<b>Cuore</b>	Riduzione / normalizzazione cardiomiopatia ipertrofica. Possibile stabilizzazione / rallentamento evoluzione danno valvolare	Riduzione / normalizzazione cardiomiopatia ipertrofica Possibile rallentamento evoluzione danno valvolare
<b>Rigidità articolare</b>	Buon effetto sulle grosse articolazioni, scarso effetto su quelle piccole	Nel primo-secondo anno migliora la performance al test del cammino di 6 minuti; l'estensione delle articolazioni migliora nel primo anno-due anni, specialmente col supporto della fisioterapia
<b>Displasia anche, gibbo lombare, genu valgum</b>	Evoluzione migliore che nel paziente non trattato, ma i segni presenti al momento del trapianto non regrediscono	Scarsa modifica della storia naturale della malattia
<b>Instabilità cranio-cervicale e compressione cervico-spinale</b>	Può persistere anche dopo trapianto	Non modificata
<b>Occhio</b>	Scarso effetto. Riportati casi di opacità corneale nonostante TCSE	Non ha effetto
<b>Udito</b>	Riportati miglioramenti sia trasmissivi che neurosensoriali	Ha effetto sulla componente trasmissiva
<b>Crescita</b>	Risultati variabili spesso non soddisfacenti	Scarsi risultati. Crescita migliore nei piccoli bambini precocemente trattati
<b>Sviluppo psicomotorio</b>	Stabilizzazione del quoziente di sviluppo	Non ha effetto psicomotorio sul quoziente di sviluppo

**Trattamento precoce prima dell'esordio della malattia** - Rare le esperienze, in famiglie dove era già diagnosticato un fratello più grande. In questi casi la terapia si è



dimostrata efficace nel prevenire la maggior parte delle manifestazioni cliniche della malattia.

## 4.2 Follow-up dei pazienti MPS I e trattamento palliativo

Il follow-up clinico dei pazienti è molto simile, che si tratti di pazienti trapiantati o trattati con TES. Questo prevede una serie di valutazioni periodiche mirate a riconoscere precocemente un problema e a permettere la messa in atto di un trattamento palliativo. La definizione di “palliativo” è in questo caso utilizzata per indicare che questo gruppo di trattamenti non è una cura specifica per la malattia, ma può significativamente migliorare la qualità di vita. Negli ultimi dieci anni sempre più pazienti con MPS I sono stati sottoposti a trattamenti cosiddetti palliativi, per molte ragioni che vanno dall’aspettativa di aumentata sopravvivenza alla maggiore comprensione dei problemi, alla maggiore esperienza sui trattamenti chirurgici, al miglioramento del trattamento anestesilogico e quindi, in definitiva, alla riduzione del rischio.

Elenchiamo nella tabella 2, per ogni apparato o sistema, i possibili problemi clinici e gli interventi che devono essere consigliati a tutti i pazienti quando sia chiaro che l’intervento terapeutico migliora la qualità di vita.

**TABELLA 2 - Protocollo assistenziale della MPS I grave**

PROBLEMA CLINICO	GESTIONE
<b>PROBLEMI ORL E RESPIRATORI</b>	
Rinorrea	Lavaggi nasali
Ipertrofia tonsille e adenoidi	Eventuale adeno-tonsillectomia
“Glu ear”	Eventuale miringotomia
Ipoacusia mista	Protesi acustiche
Ipersecrezione bronchiale	Fisioterapia
Rigidità e restringimento tracheale	Cautela intubazione per anestesia
Ipmobilità torace, infezioni ricorrenti	Fisioterapia, antibioticoterapia
Apnee nel sonno	Adeno-tonsillectomia, apnea-monitor, CPAP domiciliare
Ipertrofia aritenoidi (spesso legata a RGE)	Intervento di resezione
Insufficienza / ostruzione respiratoria non risolvibile altrimenti	Tracheostomia
<i>Controlli ORL secondo necessità clinica</i>	
<b>PROBLEMI CARDIACI</b>	
Valvulopatia mitralica e/o aortica	Profilassi per l’endocardite batterica Eventuale intervento protesico
Miocardiopatia	Trattamento farmacologico (diuretici, beta-bloccanti)
Restringimento coronarico	
<i>Visita cardiologica e monitoraggio ECG, ECOcardio a cadenza annuale</i>	
<b>PROBLEMI SCHELETRICI</b>	
Rigidità articolare	Fisioterapia
Tunnel carpale	Intervento precoce per evitare danno irreversibile al nervo periferico
Instabilità canio-cervicale e compressione cervico-spinale	Decompressione cervicale e fusione vertebrale per evitare danni al tronco cerebrale
Cifosi lombare e altri problemi della colonna	Rari gli interventi di stabilizzazione Molto dubbia l’efficacia di presidi ortopedici quali il busto
Genu valgum e displasia dell’anca	Intervento ortopedico per permettere il mantenimento di una deambulazione adeguata

<i>Controllo RX in flessione-estensione e NMR annualmente</i>	
<i>Controllo RX colonna lombare</i>	
<b>APPARATO DIGERENTE</b>	
Ernie: inguinale e/o ombelicale	Correzione chirurgica
Ipoplasia denti, ipertrofia gengivale e linguale	Igiene cavo orale e controllo odonto-stomatologico
Difficoltà alimentari	Alimentazione semiliquida o enterale o PEG
<b>PROBLEMI OCULISTICI</b>	
Acuità visiva	Valutazione della retina; ERG e PEV
Glaucoma	Esame della cornea
Opacità corneale	Trattamenti farmacologici
	Trapianto di cornea
<b>PROBLEMI NEUROLOGICI</b>	
- Cranio: possibile idrocefalo iperteso (da distinguere da idrocefalo ex vacuo)	Eventuale derivazione
<i>Controllo NMR o TAC cerebrale</i>	
Epilessia	
<i>Controllo EEG</i>	
- Problemi neurologici periferici: compressione nervi periferici (tunnel carpale)	
<i>Possono essere indicati VCN, EMG e potenziali somatosensoriali (PESS)</i>	
<b>VACCINAZIONI</b>	
Il bambino con MPS I esegue tutte le vaccinazioni, analogamente al bambino sano. Il bambino trapiantato dovrà rivolgersi, a questo proposito, al proprio centro trapianti di riferimento.	

#### 4.2.1 Rischi anestesilogici

I pazienti affetti da MPS I hanno un rischio anestesilogico aumentato e devono perciò essere sedati e intubati solo in centri specializzati dove il team anestesilogico sia a conoscenza dei rischi insiti nella patologia e abbia a disposizione maschera laringea e endoscopio a fibre ottiche.

Le cause dell'aumentato rischio anestesilogico sono molteplici: l'ipertrofia e l'infiammazione delle mucose che sono anche molto fragili e facilmente sanguinanti, il collo corto, la lingua ipertrofica, l'iperplasia di tonsille ed adenoidi, l'epiglottide dislocata in alto, i restringimenti multipli della laringe e della trachea, le malformazioni vertebrali. Tutti questi problemi tendono a peggiorare con l'età e sono controllati solo parzialmente dai trattamenti specifici.

Nonostante ciò, la posizione attuale è che se un paziente può avere un beneficio concreto da un intervento che richiede sedazione, questo deve essere fatto, garantendo la sicurezza anestesilogica.

## 5. PRESA IN CARICO SOCIOASSISTENZIALE DEL PAZIENTE

Come accade per tutte le malattie rare e complesse, anche per la MPS I è necessario che sia fornita una assistenza globale, che coinvolge vari specialisti e che riguarda sia aspetti più tradizionalmente medici sia aspetti di carattere socio-sanitario, volti a garantire l'autonomia personale e la migliore integrazione nel contesto sociale. In questo percorso di assistenza globale tutta la famiglia è coinvolta sul piano affettivo e psicologico, pratico e organizzativo e sociale.

L'allegato 1 riporta i dettagli - utili al medico e alle famiglie - dell'attuale normativa di riferimento sulle necessità e i diritti dei soggetti diversamente abili,

normativa che non è sempre ben conosciuta o messa in atto dalle strutture di riferimento.

## **6. CONSULENZA GENETICA E DIAGNOSI PRENATALE**

La MPS I è ereditata con modalità autosomica recessiva. I genitori dell'individuo affetto sono entrambi eterozigoti obbligati (portatori sani) e ad ogni gravidanza hanno un rischio pari al 25% di avere un figlio affetto da MPS I. Oltre ai genitori anche altri membri della famiglia potrebbero essere eterozigoti.

L'identificazione degli eterozigoti non può basarsi sul dosaggio enzimatico, ma deve invece passare attraverso la dimostrazione di una mutazione del gene IDUA. Pertanto è necessario che in ogni bambino che riceve una diagnosi biochimica di difetto enzimatico di  $\alpha$ -L-iduronidasi si proceda all'analisi mutazione del gene IDUA.

La diagnosi prenatale di MPS I può essere effettuata attraverso la determinazione dell'attività enzimatica oppure attraverso lo studio delle mutazioni del gene IDUA sulle cellule fetali derivate da villocentesi effettuata intorno alla 10<sup>a</sup>-12<sup>a</sup> settimana o sugli amniociti ottenuti da amniocentesi alla 15<sup>a</sup>-18<sup>a</sup> settimana. In alcuni paesi è possibile la diagnosi preimpianto, secondo le normative vigenti.

## **7. PROSPETTIVE FUTURE: SCREENING NEONATALI E ALTRE TERAPIE**

### **7.1 Gli screening neonatali**

Lo screening neonatale è un programma di salute pubblica che ha lo scopo di individuare tra tutti i nuovi nati quelli a rischio per una determinata malattia congenita in modo da poter intervenire in fase presintomatica al fine di evitare precoci mortalità, morbidità e disabilità..

L'American College of Medical Genetics, gruppo costituito da specialisti in sanità pubblica, politica sanitaria, etica e altri settori interessati negli screening neonatali, nel 2006 ha effettuato una review della letteratura scientifica relativamente agli screening neonatali e ha indicato, tra le patologie che potrebbero essere valutate per l'inserimento nel programma di screening, alcune malattie lisosomiali quali la MPS I, la malattia di Fabry, la malattia di Pompe, la malattia di Gaucher e la malattia di Krabbe.

Argomentazioni a favore dell'inserimento delle malattie da accumulo lisosomiale negli screening neonatali sono state l'aumento della disponibilità di possibilità terapeutiche - TES, SRT (inibizione della sintesi del substrato), TCSE - e la probabile sottostima, in alcuni casi anche molto consistente, della prevalenza delle malattie da accumulo nella popolazione mondiale. Un problema fondamentale, ancora non risolto e che riveste anche connotazioni etiche importanti, è l'impossibilità, attualmente, di prevedere il fenotipo della malattia alla nascita.

Questo è valido soprattutto per l'MPS I, l'unica MPS per la quale il trapianto di cellule staminali ematopoietiche rappresenta il gold standard terapeutico nel caso di una forma severa sotto i due anni e con un quoziente di sviluppo superiore a 70.

Al momento attuale, non esiste alcun metodo clinico o sperimentale, ad eccezione di poche mutazioni (es. pW420X e le eterozigosi composte per mutazioni stop codons) che possa pronosticare con certezza la severità della malattia. Questo, tuttavia, non confuta la validità dello screening neonatale. Sarà infatti necessario somministrare l'enzima ricombinante immediatamente dopo la nascita e seguire il paziente nello sviluppo neuromotorio e cognitivo. Le forme severe, infatti, già nel primo anno di vita potranno "facilmente" essere diagnosticate per il ritardo con il quale vengono raggiunte le tappe neuro psicomotorie tipiche del primo anno di vita. Inoltre, sono in fase di studio programmi di ricerca per l'identificazione di biomarcatori, diversi dai GAG urinari, che possano essere utili a pronosticare la severità della malattia.

## **7.1 Prospettive di Terapia Genica per la MPS I**

Per terapia genica si intende il tentativo di correggere malattie genetiche o acquisite mediante il trasferimento di geni normali terapeutici in cellule malate allo scopo di correggerne il difetto. Il trasferimento viene effettuato mediante l'uso di virus modificati non patogeni in grado solo di trasferire informazioni genetiche nelle cellule malate. La correzione può avvenire correggendo le cellule malate al di fuori dell'organismo del paziente (terapia genica ex vivo) o mediante iniezione diretta del vettore virale nell'organismo malato (terapia genica in vivo).

La Mucopolisaccaridosi è stata una delle prime malattie da accumulo lisosomiale per la quale si sono messi a punto protocolli di terapia genica ex vivo che prevedevano l'infezione delle cellule di midollo autologhe (ossia provenienti dallo stesso animale malato) reimpiantate dopo la correzione. Il trapianto autologo, ovviamente, evita tutti gli effetti collaterali derivanti da fenomeni di rigetto da parte delle cellule dell'ospite e del donatore. Con questa metodica sono stati trattati topi e cani affetti da MPS I che hanno dimostrato di beneficiare del trattamento con una progressiva riduzione dei GAG urinari, dell'organomegalia ed un sensibile miglioramento della mobilità articolare. Questi risultati erano tanto maggiori quanto più precoce era la terapia. In seguito a questi risultati, è in fase di progettazione un trial clinico di fase I che prevede lo studio di tossicità di vettori lentivirali utilizzati per infettare le cellule ematopoietiche staminali che possono poi essere infuse.

## Bibliografia di riferimento

1. Boelens JJ, Prasad VK, Tolar J, Wynn RF, Peters C. *Current International perspectives on hematopoietic stem cell transplantation for inherited metabolic disorders*. *Pediatr Clin N Am*. 2010 Feb;57:123-145.
2. Cartier N, Aubourg P. *Hematopoietic stem cell gene therapy in Hurler syndrome, globoid cell leukodystrophy, metachromatic leukodystrophy and X-adrenoleukodystrophy*. *Curr Opin Mol Ther*. 2008 Oct;10(5):471-8.
3. Clarke LA, Wraith JE, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Sidman M, Kakkis ED, Cox GF. *Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I*. *Pediatrics*. 2009 Jan;123(1):229-40.
4. Gabrielli O, Clarke LA, Bruni S, Coppa GV. *Enzyme-replacement therapy in a 5-month-old boy with attenuated presymptomatic MPS I: 5-year follow-up*. *Pediatrics*. 2010 Jan;125(1):e183-7. Epub 2009 Dec 21.
5. Herati RS, Knox VW, O'Donnell P, D'Angelo M, Haskins ME, Ponder KP. *Radiographic evaluation of bones and joints in mucopolysaccharidosis I and VII dogs after neonatal gene therapy*. *Mol Genet Metab*. 2008 Nov;95(3):142-51.
6. Herati RS, Ma X, Tittiger M, Ohlemiller KK, Kovacs A, Ponder KP. *Improved retroviral vector design results in sustained expression after adult gene therapy in mucopolysaccharidosis I mice*. *J Gene Med*. 2008 Sep;10(9):972-82.
7. Hobbs JR, Barret AJ, Chambers D et al. *Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after bone marrow transplantation*. *Lancet* ii, 709, 1981.
8. Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, Izykowski B, Philips J, Doroshov R, Walot I, Hoft R, Neufeld EF. *Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I*. *N Engl J Med* 2001;344(3):182-8.
9. Matalon R, Dorfman A. *Hurler's syndrome, an alpha-L-iduronidase deficiency*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;47:959-964.
10. Metcalf JA, Ma X, Linders B, Wu S, Schambach A, Ohlemiller KK, Kovacs A, Bigg M, He L, Tollefsen DM, Ponder KP. *A self-inactivating gamma-retroviral vector reduces manifestations of mucopolysaccharidosis I in mice*. *Mol Ther*. 2010 Feb;18(2):334-42.
11. Muenzer J, Wraith JE, Clarke LA. *International Consensus Panel on Management and Treatment of Mucopolysaccharidosis I. Mucopolysaccharidosis I: management and treatment guidelines*. *Pediatrics*. 2009 Jan;123(1):19-29.
12. Wraith JE, Clarke LA, Beck M, Kolodny EH, Pastore GM, et al. *Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: A randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant Human  $\alpha$ -L-iduronidase (Laronidase)*. *The Journal of Pediatrics*, May 2004 144(5):581-88.

## **Allegato 1**

### **I diritti del paziente diversamente abile**

#### *Il diritto alla diagnosi: la certificazione di malattia rara*

Il primo diritto del malato è la diagnosi della propria patologia (*Risoluzione ONU 48/96 - A/48/627*).

Il sospetto diagnostico formulato dal Medico di Famiglia o dal Pediatra di Libera Scelta deve portare all'invio presso i Centri di diagnosi e cura (o presidi ospedalieri) della *Rete nazionale malattie rare* (ai sensi del D.M. n. 279/2001). Nel caso in cui nella propria Regione di residenza non vi siano centri specifici, l'assistito può rivolgersi ad una struttura riconosciuta dalle altre Regioni. Il Centro, effettuata la diagnosi biochimica e/o molecolare, consegna alla famiglia la certificazione di malattia rara che deve essere presentata alla Unità Sanitaria Locale di residenza e conferisce il titolo all'esenzione dalla partecipazione alle spese per le prestazioni sanitarie relative alla patologia.

#### *I diritti dei bambini e delle bambine in Ospedale*

Le patologie croniche comportano un frequente ricorso alle ospedalizzazioni. La *Carta dei Diritti dei Bambini e delle Bambine in Ospedale* indica gli obiettivi umani per assicurare il rispetto dei diritti soggettivi: assoluta necessità di ricovero, durata minore possibile, vicinanza dei care giver abituali (genitori) per tutta la durata della degenza, informazione dettagliata sulle condizioni cliniche e sulle terapie da attuare in modo che possano essere recepite in modo adeguato alle conoscenze e alle capacità di comprensione delle persone coinvolte, ricovero in strutture assieme a coetanei con medesime esigenze di crescita e di sviluppo, ambienti di ricovero che consentano di proseguire attività ludiche e ricreative.

#### *Certificazione di invalidità civile e prestazioni economiche e assistenziali correlate*

L'aumentato fabbisogno di cure e la ridotta autonomia richiedono un impegno economico per la famiglia di origine in termini di spese vive e di compensi per care giver alternativi. Per questi motivi è importante adottare strumenti di sostegno sociale che si concretizzano nel riconoscimento di uno stato di invalidità civile.

L'invalidità civile per il minore di 18 anni corrisponde alla dimostrazione di difficoltà persistenti a svolgere compiti o funzioni proprie dell'età. Per i soggetti maggiorenni l'invalidità civile si configura attraverso la dimostrazione di menomazioni congenite o acquisite, anche progressive (insufficienze mentali derivanti da deficit sensoriali e funzionali), comportanti una riduzione della capacità lavorativa non inferiore a 1/3.

L'iter per l'accertamento è stato modificato a partire dall'1 gennaio 2010 (*art. 20 del D.L. n. 78/2009* convertito con modificazioni nella *Legge 102* del 3 agosto 2009). La domanda deve essere inoltrata all'INPS esclusivamente per via telematica (applicazione InvCiv2010, sul sito [www.inps.it](http://www.inps.it)) dal medico curante (Medico di Famiglia o Pediatra di Libera Scelta). Alla fine della procedura viene rilasciata una ricevuta con data e numero di protocollo (PIU).

L'accertamento avviene attraverso una Commissione Medica Integrata, che può esprimere un giudizio all'unanimità oppure a maggioranza. In questo ultimo caso il Responsabile del Centro medico legale territorialmente competente può disporre una seconda visita da effettuarsi entro 20 giorni.

L'accertamento della Invalidità Civile permette di beneficiare di Prestazioni economiche (Indennità mensile di frequenza, Assegno mensile, Pensione di Inabilità). L'indennità di accompagnamento è una prestazione economica valida per tutte le età e spetta a tutti gli inabili totali non autosufficienti o non auto deambulanti (anche di età inferiore ai tre anni di vita: *Sentenza Corte Costituzionale 467/2002*).

L'accertamento di Invalidità Civile inoltre permette di beneficiare dell'erogazione di presidi già con il semplice PIU (il numero di protocollo garantisce accesso al servizio): pannolini, sedia a rotelle, stampelle, deambulatore, letto articolato, tutori, garze, siringhe, cateteri, apparecchiature salvavita, materiale di consumo per attrezzature salvavita.

L'accertamento dell'Invalidità Civile permette anche l'erogazione di specifica assistenza (interventi per la cura e la riabilitazione *precoce* della persona con handicap, specifici interventi riabilitativi e ambulatoriali, a domicilio o presso centri socio-riabilitativi ed educativi a carattere diurno o residenziale, fornitura e riparazione di apparecchi, attrezzature, protesi e sussidi tecnici necessari per il trattamento delle menomazioni).

### Il diritto alla mobilità

Il *Diritto alla mobilità* del paziente diversamente abile viene tutelato attraverso le normative che impongono l'abbattimento delle barriere architettoniche dagli edifici pubblici, dagli edifici privati, dall'edilizia residenziale pubblica, dagli uffici, dagli spazi e dai servizi pubblici (*DPR 384/1978, L 41/1986, L 13/1989, DM 236/1989, DPR 503/1996*). Sono previste agevolazioni fiscali per adeguare le strutture in tal senso: detrazioni IRPEF senza franchigia delle spese per trasporto in ambulanza, poltrone per inabili non deambulanti, apparecchi per fratture, ernie e correzione colonna, costruzione di rampe interne o esterne, trasformazione ascensore per contenere la carrozzella, mezzi necessari all'accompagnamento, alla deambulazione e al sollevamento dei disabili, indipendentemente dal fatto che beneficino dell'indennità di accompagnamento. E' prevista una riduzione dell'aliquota IVA al 4% per l'acquisto di mezzi di trasporto o di sollevamento. Le ristrutturazioni edilizie per facilitare la mobilità interna sono sottoposte ad un'aliquota IVA del 4 %; le spese sostenute concorrono per il 36 % alla detrazione dell'imponibile, e per la quota eccedente si può chiedere una detrazione d'imposta del 19%.

Le spese per l'acquisto di mezzi di trasporto (nuovi o usati, anche non adattati) concorrono per il 19 % alla detrazione di imposta una sola volta ogni 4 anni; l'IVA è ridotta al 4 % e si ha diritto all'esenzione dal pagamento della tassa di circolazione (cilindrata < 2000 cc benzina e < 2800 cc diesel) e alle imposte di trascrizione sui passaggi di proprietà.

*Altre agevolazioni fiscali* riguardano le detrazioni per un figlio disabile a carico, l'intassabilità totale o parziale della quota ereditaria o del legato spettante al diversamente abile e la riduzione e/o sospensione al pagamento dell'ICI dei nuclei familiari con a carico un invalido civile per oltre il 75 %.

### Il diritto all'educazione

Il Diritto all'Educazione viene tutelato espressamente (*Art 38 della Costituzione, Circolare 33/1993, DPR 24-2-1994, L 162/1998*). Il diritto non si limita all'apprendimento ma interessa tutto l'ambito educativo, comprendendo aspetti quali il confronto con coetanei, l'autonomia personale, i mezzi e gli strumenti relazionali sociali.

In questa ottica l'inserimento in una comunità scolastica di qualsiasi ordine e grado rappresenta uno strumento terapeutico e, per questo motivo, è stata sancita la garanzia dell'inserimento del bambino disabile sia negli asili nido pubblici (*Sentenza Corte Costituzionale 215/1987; Art 12 della L 104/92*) che in tutte le scuole e gli istituti di istruzione di ogni ordine e grado, indipendentemente dalla presenza di difficoltà di apprendimento o di altri ostacoli derivanti dalle disabilità. La frequenza scolastica rappresenta a tutti gli effetti un programma riabilitativo occupazionale, e non può configurarsi come un "parcheggio" o un alleviamento del carico assistenziale per la famiglia. A questo scopo deve essere predisposto un Piano Educativo Individualizzato (PEI) che deve comprendere: 1. una diagnosi funzionale educativa (*Momento conoscitivo dei punti di forza/debolezza e bisogni educativi speciali*), 2. un profilo dinamico funzionale (*Momento di definizione di obiettivi e di scelte progettuali*), 3. la definizione di attività, materiali e metodi di lavoro (*Definizione di tecniche e risorse di lavoro*), 4. una verifica delle acquisizioni e dell'appropriatezza degli obiettivi (*Revisione e correzione*).

Le necessità speciali dell'alunno sono in parte soddisfatte direttamente dalla scuola per quanto riguarda sussidi tecnici e informatici (fax, modem, computer, telefono viva voce, schermo a tocco, tastiera espansa) e in parte con agevolazioni per gli acquisti da parte della famiglia (IVA 4 % ai sensi dell'*art 3 L 104/1992*), a patto che esista una prescrizione medico specialistica della ASL del collegamento funzionale tra menomazione e sussidio ed un certificato dalla ASL attestante l'invalidità funzionale (motoria, o uditiva, o visiva, o del linguaggio) e il carattere permanente della stessa.

La scuola si fa carico di un insegnante dedicato di sostegno per sviluppare un metodo di apprendimento individualizzato delle nozioni e dei concetti (secondo le indicazioni del PEI), e il Comune di assistenti educativi (AEC) per soddisfare bisogni di autonomia personale (igiene, pasto, mobilità interna).

La continuità terapeutica durante l'orario scolastico è garantita dal Protocollo per la Somministrazione dei Farmaci a Scuola (Ministero della pubblica Istruzione e Ministero della Sanità, 25/11/2005).

E' possibile ottenere metodi di valutazione di profitto personalizzati sulle performance del paziente diversamente abile in tutti gli ordini e gradi della formazione scolastica e universitaria (quiz a risposta multipla anziché interrogazioni orali, scrittura elettronica anziché a penna).

### Il diritto all'integrazione sociale

Il Diritto all'Integrazione Sociale viene tutelato dapprima con l'inserimento nella popolazione scolastica e quindi nel mondo del lavoro (*L 482/1968; L 68/1999; DM 91/2000; Circ Min Lavoro e Prev Sociale 4/2000*). E' previsto un collocamento obbligatorio per diversamente abili con riduzione della capacità lavorativa superiore al 45%, attraverso assunzione in aziende private e strutture



pubbliche con più di 15 dipendenti, partiti politici, organizzazioni sindacali e sociali, o anche occupazioni con mansioni a domicilio o con modalità di telelavoro.

### Il congedo parentale

Tra i presidi e le agevolazioni per sostenere la famiglia con un paziente diversamente abile a carico, è importante ricordare l'esistenza di congedi parentali: diritto al prolungamento fino a tre anni del periodo di astensione facoltativa dal lavoro, a condizione che il disabile non sia ricoverato a tempo pieno o, in alternativa, due ore giornaliere di permesso retribuito fino al compimento del terzo anno. Successivamente al terzo anno, chi assiste essendo parente fino al terzo grado ha diritto a tre giorni di permesso mensile (contribuzione figurativa, pari all'80%), fruibile anche in modo continuativo.

Il lavoratore pubblico o privato che assista con continuità figlio o affine entro il terzo grado ha diritto di scegliere, ove possibile, una sede di lavoro più vicina al proprio domicilio e non può essere trasferito in altra sede senza consenso.

Il permesso giornaliero è fruibile per il figlio disabile maggiorenne dal convivente anche se l'altro genitore non lavora o se siano presenti in famiglia altri soggetti non lavoratori in grado di prestare assistenza. Per il figlio maggiorenne non convivente devono ricorrere requisiti di continuità ed esclusività dell'assistenza (altro genitore che non lavora o assente) o mancanza di altri soggetti non lavoratori.

Il mancato possesso di patente da parte di un familiare non lavoratore convivente può essere motivo per la concessione dei permessi a favore di un familiare lavoratore convivente, a patto che non siano disponibili altri servizi di trasporto e solo per i giorni in cui tale necessità è rilevabile, anche se ricorrente o fissata in date prestabilite.

L'Art 3, c 106 della L 350/2003 ha abrogato la condizione che imponeva quale requisito della concessione dei permessi retribuiti che il disabile fosse in possesso di certificato di handicap grave da almeno cinque anni (vecchio art 4 bis della L 1204/1971).

## **CAPITOLO 3**

**PROGETTO 2: VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELLA TERAPIA ORALE CON TETRAIDROBIOPTERINA (BH<sub>4</sub>), NEL RIDURRE I LIVELLI PLASMATICI DI FENILALANINA IN TUTTI I PAZIENTI CON IPERFENILALANINEMIA (HPA) E VALUTAZIONE DELLA TOLLERABILITÀ E DELLA SICUREZZA DEL TRATTAMENTO CON BH<sub>4</sub> A LUNGO TERMINE.**

*Studio Finanziato dalla Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA)*

*Protocollo FARM5MATC7*

## 3.1 INTRODUZIONE

L'iperfenilalaninemia (HPA; MIM 261600) è un errore congenito del metabolismo, a carico del *pathway* metabolico dell'aminoacido fenilalanina (Phe), ereditato con modalità autosomica recessiva.

La HPA rappresenta uno dei più frequenti errori congeniti del metabolismo. L'incidenza di tale patologia in Europa e negli Stati Uniti nella razza caucasica è di 1 affetto ogni 10.000 - 20.000 nati vivi, ma in alcune popolazioni la prevalenza è risultata ancora maggiore (Scriber CR et al., 2001). Nel 98% dei casi, le HPA sono causate da mutazioni nel gene che codifica per l'enzima fenilalanina idrossilasi (PAH, EC 1.14.16.1) (Scriber CR et al., 2001). La PAH è un enzima espresso prevalentemente nel fegato (ma è espresso anche nel rene e nel pancreas) e catalizza in modo irreversibile l'idrossilazione della Phe, un aminoacido essenziale, in tirosina (Tyr) (**Figura 1**).

La PAH è il principale determinante *in vivo* dell'omeostasi e del metabolismo della Phe, e la riduzione e/o l'assenza della sua attività determina un aumento delle concentrazioni plasmatiche della Phe, che sono considerate tossiche per il cervello, e una ridotta produzione di tirosina.

La fenilalanina è un aminoacido essenziale che partecipa alla costituzione delle più comuni proteine alimentari. Viene normalmente metabolizzata nell'organismo secondo cinque vie differenti (**Figura 2**):

1. Idrossilazione a livello dell'anello benzenico in posizione para che porta a tirosina;
2. Utilizzazione per la sintesi proteica;
3. Idrossilazione a livello dell'anello benzenico in posizione orto che porta a ortotirosina;
4. Transaminazione con l'acido  $\alpha$ -chetoglutarico, che porta ad acido fenilpiruvico;

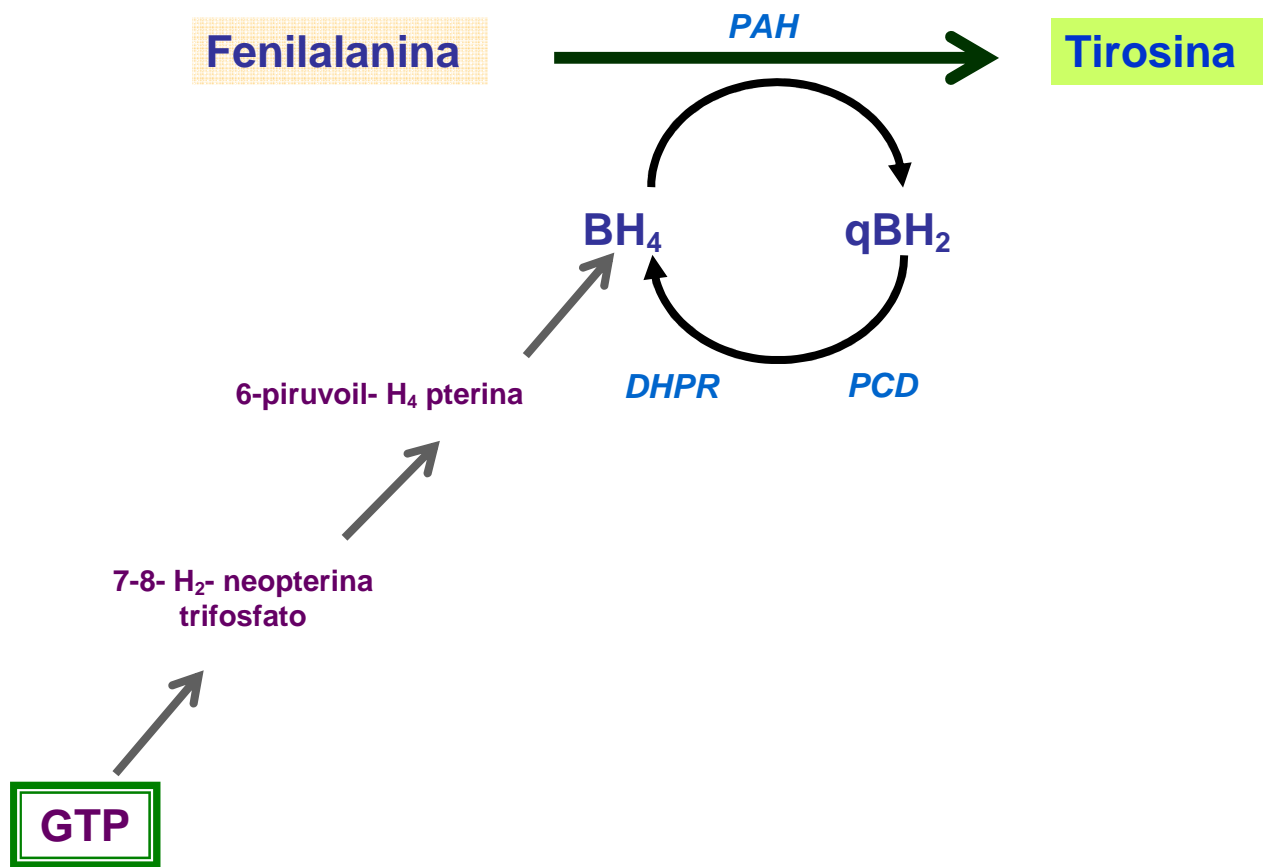
5. Decarbossilazione, che conduce alla formazione di feniletilamina, ammina simpaticomimetica biologicamente attiva.

La via quantitativamente più importante è quella che conduce a tirosina ed è proprio a questo livello che si verifica il blocco metabolico che porta alla HPA. Il blocco della principale via catabolica della Phe determina, in caso di un apporto alimentare normale (**Figura 2**):

- Incremento notevole della fenilalaninemia;
- Abnorme escrezione urinaria di acido fenilpiruvico, acido fenilattico, acido fenilacetico ed acido ortoidrossifenilpiruvico, che non sono di per sé metaboliti anomali (Walter JH et al., 2006)
- Riduzione dei livelli plasmatici di tirosina.

Altre anomalie biochimiche riscontrate nelle HPA sono (**Figura 2**):

- Diminuita biosintesi di melanina, per inibizione competitiva della Phe sulla tirosinasi;
- Diminuzione dei livelli plasmatici di 5-OH-triptamina, di dopamina e di GABA per inibizione delle decarbossilasi specifiche, ad opera dell'acido fenilpiruvico;
- Elevata escrezione urinaria di composti indolici e di indacano.

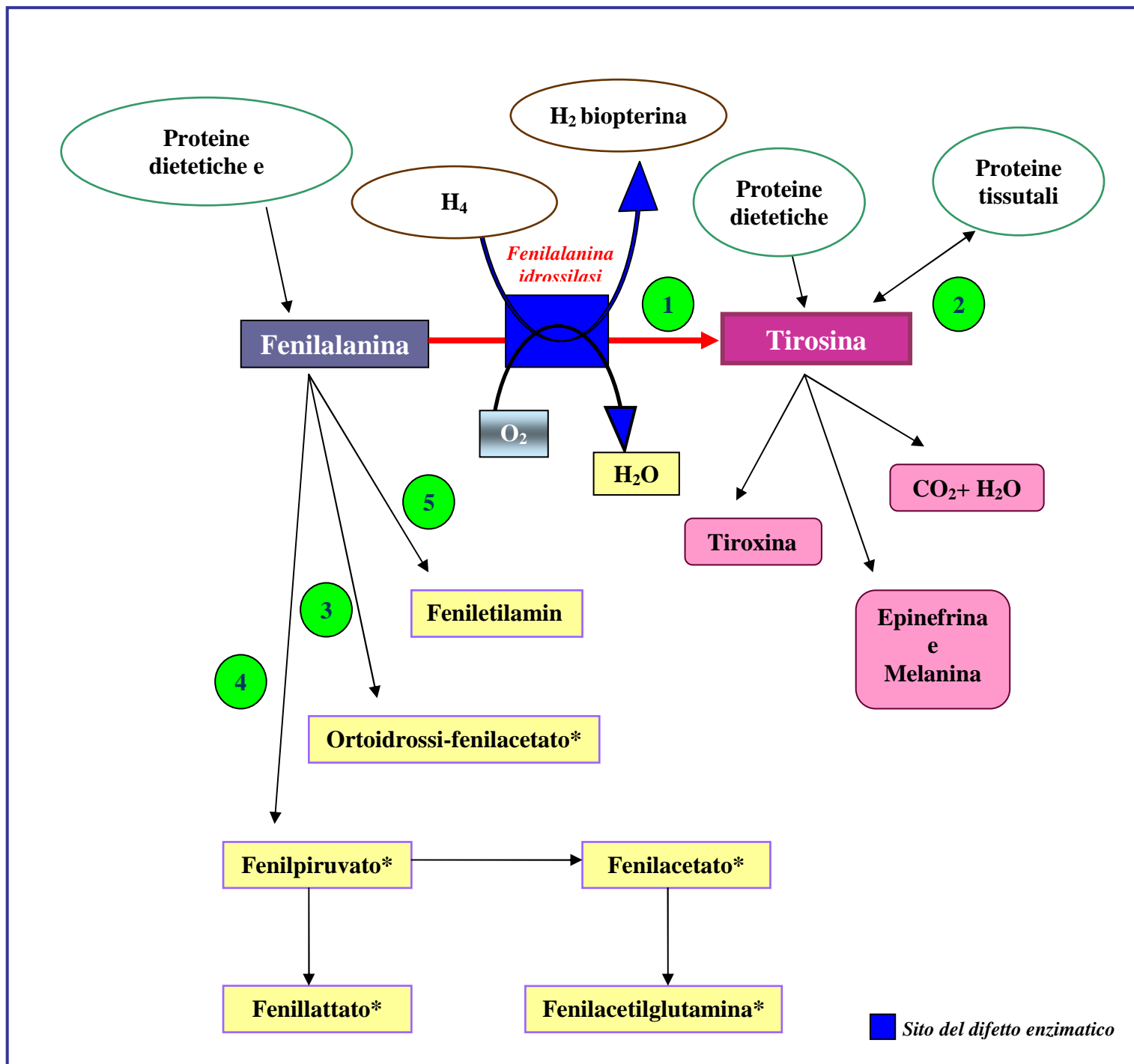


**Figura 1**

**Idrossilazione della fenilalanina:**

La fenilalanina viene idrossilata a tirosina mediante l'attività catalitica della fenilalanina idrossilasi (PAH), che richiede la presenza del cofattore pterina non coniugato, la tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Durante il processo di idrossilazione della fenilalanina, la BH<sub>4</sub> viene ossidata a chinonoide diidrobiopterina (qBH<sub>2</sub>). La forma attiva di BH<sub>4</sub> viene poi rigenerata attraverso l'azione sequenziale della PCD pterina-4a-carbinolamina deidratasi e della diidrobiopteridina reduttasi (DHPR) o potrebbe essere sintetizzata de novo dalla guanosina trifosfato (GTP).

(Figura ripresa da Harding CO, 2010)



\* prodotti di accumulo in pazienti con HPA

**Figura 2**

### Metabolismo della fenilalanina nelle iperfenilalaninemie

La fenilalanina viene normalmente metabolizzata nell'organismo secondo cinque vie differenti:

1. Idrossilazione a livello dell'anello benzenico in posizione para che porta a tirosina;
2. Utilizzazione per la sintesi proteica;
3. Idrossilazione a livello dell'anello benzenico in posizione orto che porta a ortotirosina;
4. Transaminazione con l'acido  $\alpha$ -chetoglutarico, che porta ad acido fenilpiruvico;
5. Decarbossilazione, che conduce alla formazione di feniletilamina, ammina simpaticomimetica biologicamente attiva.

Figura modificata da Ross Metabolic Formula System, Nutrition Support Protocols 3rd Edition

Il deficit di PAH determina HPA di grado variabile di severità. La classificazione delle HPA da deficit dell'enzima PAH tiene conto di due parametri che si correlano strettamente con *l'attività enzimatica residua*: livelli di Phe riscontrati alla diagnosi e la tolleranza a tale aminoacido. Per *tolleranza* si intende il più alto intake di Phe tale da consentire una fenilalaninemia compresa nel range considerato "sicuro" (120-360 µmol/L). Tale classificazione permette di suddividere le HPA in :

- **PKU classica** (Classic PKU o HPA I), con livelli di Phe alla diagnosi >1200 µmol/L e una tolleranza di 250-350 mg di Phe/die (*attività enzimatica residua stimata <1%*);
- **PKU lieve** (Mild PKU o HPA II), con livelli di Phe alla diagnosi compresi tra 600 e 1200 µmol/L e una tolleranza di 350-400 mg di Phe/die (*attività enzimatica residua stimata compresa tra l' 1 e il 5%*);
- **Iperfenilalaninemia lieve** (MHP o HPA III), con livelli di Phe alla diagnosi <600 µmol/L e una tolleranza di 400-600 mg di Phe/die (*attività enzimatica residua stimata >5%*).

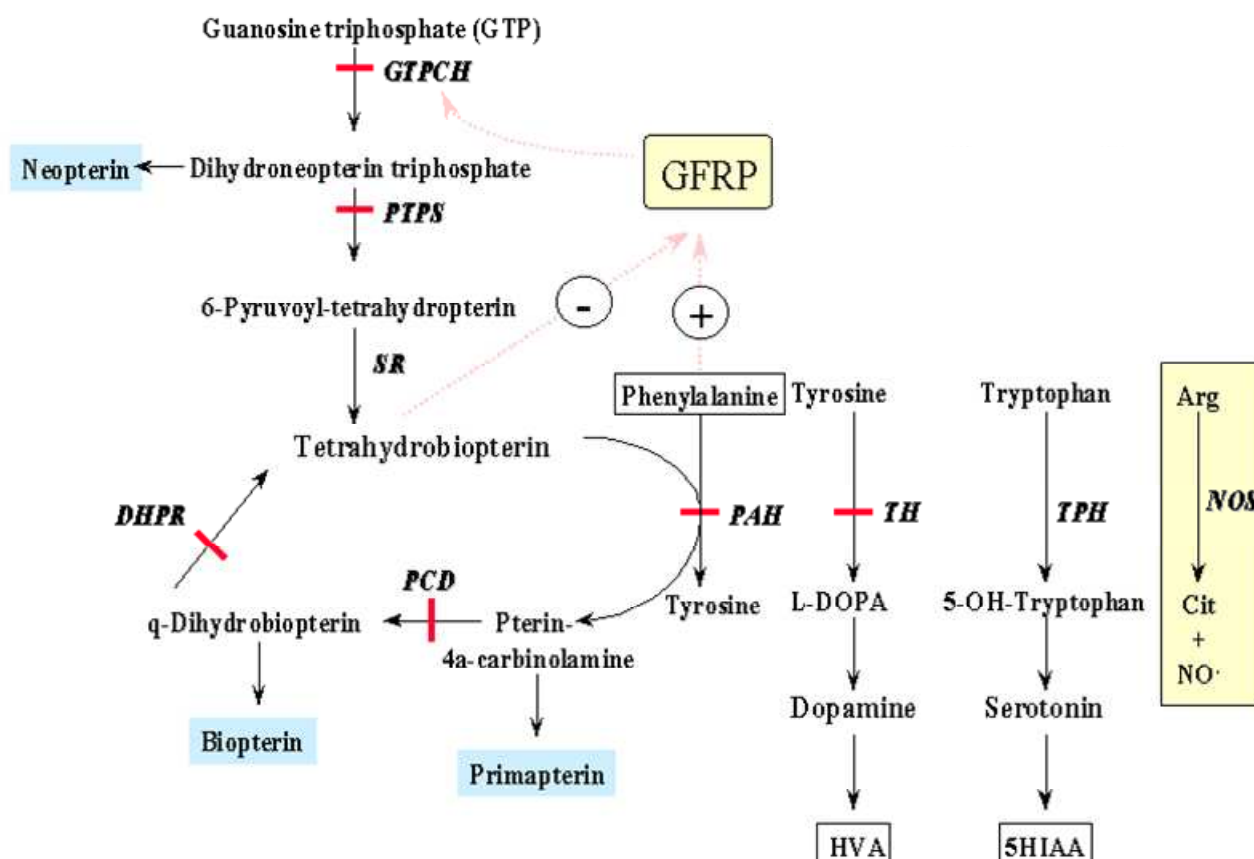
La severità del fenotipo biochimico dipende, nella maggior parte dei casi, dal tipo di mutazione e quindi dall'attività enzimatica residua; dagli studi pubblicati si evince però che questa correlazione non è così semplice e scontata e che i fattori che possono modificare l'espressione fenotipica sono molteplici (Guldberg P et al., 1998).

La PAH è un omotetramero che per svolgere la sua attività catalitica richiede la presenza di molecole di ossigeno, ferro, e un cofattore, la tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>).

Nel 2% dei casi, l'HPA è determinata da un gruppo di alterazioni riguardanti i pathways di biosintesi e rigenerazione della BH<sub>4</sub>. Infatti, la BH<sub>4</sub> può essere sintetizzata *de novo* in diversi tessuti, incluso il fegato, a partire dalla guanosina trifosfato (GTP), ma può anche essere *riciclata* dopo l'idrossilazione della fenilalanina attraverso una reazione enzimatica di riduzione (Thony B et al., 2000) (**Figura 1**). Generalmente il trattamento di questa forma di HPA, un tempo chiamata PKU maligna, consiste nella integrazione orale di BH<sub>4</sub> e di neurotrasmettitori.

La BH<sub>4</sub> è implicata nelle reazioni di idrossilazione di tutti gli amminoacidi aromatici (Phe, tirosina e triptofano), e pertanto svolge un ruolo fondamentale nella sintesi di due neurotrasmettitori: la dopamina e la serotonina, entrambi cruciali per lo sviluppo del sistema nervoso centrale (**Figura 3**).





**Figura 3**

**Biosintesi e rigenerazione della tetraidrobiopterina con i possibili difetti metabolici e il catabolismo della fenilalanina**

*GTPCH, GTP cicloidrolasi; PTPS, piruvoloil-tetraidrobiopterina sintasi SR, sepiapterina reduttasi; DHPR, diidropteridina reduttasi; PCD, pterin-4a-carbinolamina deidratasi; DHFR, diidrofolato reduttasi; GFRP, proteina stimolante la GTP Ciclo idrolasi; PAH, Fenilalanina idrossilasi; TH, tirosina idrossilasi; TPH, triptofano idrossilasi; NOS, ossido nitrico sintetasi; HVA, acido omovanillico; 5HIAA, acido 5-idrossiindolacetico; Arg, arginina; Cit, citrullina.*

## 3.2 QUADRO CLINICO

La storia naturale della malattia, se non trattata precocemente, è dominata da un progressivo e irreversibile danno neurologico con un grave ritardo mentale.

Livelli persistentemente elevati delle concentrazioni plasmatiche della Phe, riscontrati in pazienti non trattati, sono state infatti associate a grave ritardo dello sviluppo psicomotorio, scarsa crescita, difficoltà nel comportamento e ad altre condizioni cliniche patologiche.

Più della metà dei bambini fenilchetonurici nasce con caratteristiche somatiche tipiche della malattia: cute chiara, occhi azzurri e capelli biondi, sintomi questi da porre in relazione al difetto di pigmentazione, secondario alle alterazioni del metabolismo della melanina. Possono notarsi nei primi mesi di vita un odore particolare, descritto da alcuni come un caratteristico odore di topo (dovuto all'escrezione di acido fenilacetico), eczema nel 20-40% dei casi, microcefalia, scarso accrescimento ed una particolare irritabilità. Si rende poi evidente il ritardo mentale grave ( $QI < 50\%$ ) accompagnato da iperattività, comportamenti autistici, movimenti afinalistici e stereotipati. È frequente il riscontro di segni piramidali, quali ipertono muscolare con riflessi osteotendinei iperevocabili, spasticità, manifestazioni Parkinson-simili quali movimenti coreo-atetosici e disturbi della deambulazione. Circa l'80% dei ragazzi affetti non trattati dalla nascita presenta alterazioni aspecifiche elettroencefalografiche, accompagnate da epilessia nel 25% dei casi; il tessuto cerebrale di questi pazienti presenta all'esame istologico una ridotta arborizzazione dendritica, alterata sinaptogenesi e disturbi della mielinizzazione. Fortunatamente lo screening neonatale ha reso ormai la classica presentazione clinica della PKU solo un lontano ricordo.

### 3.3 PATOGENESI

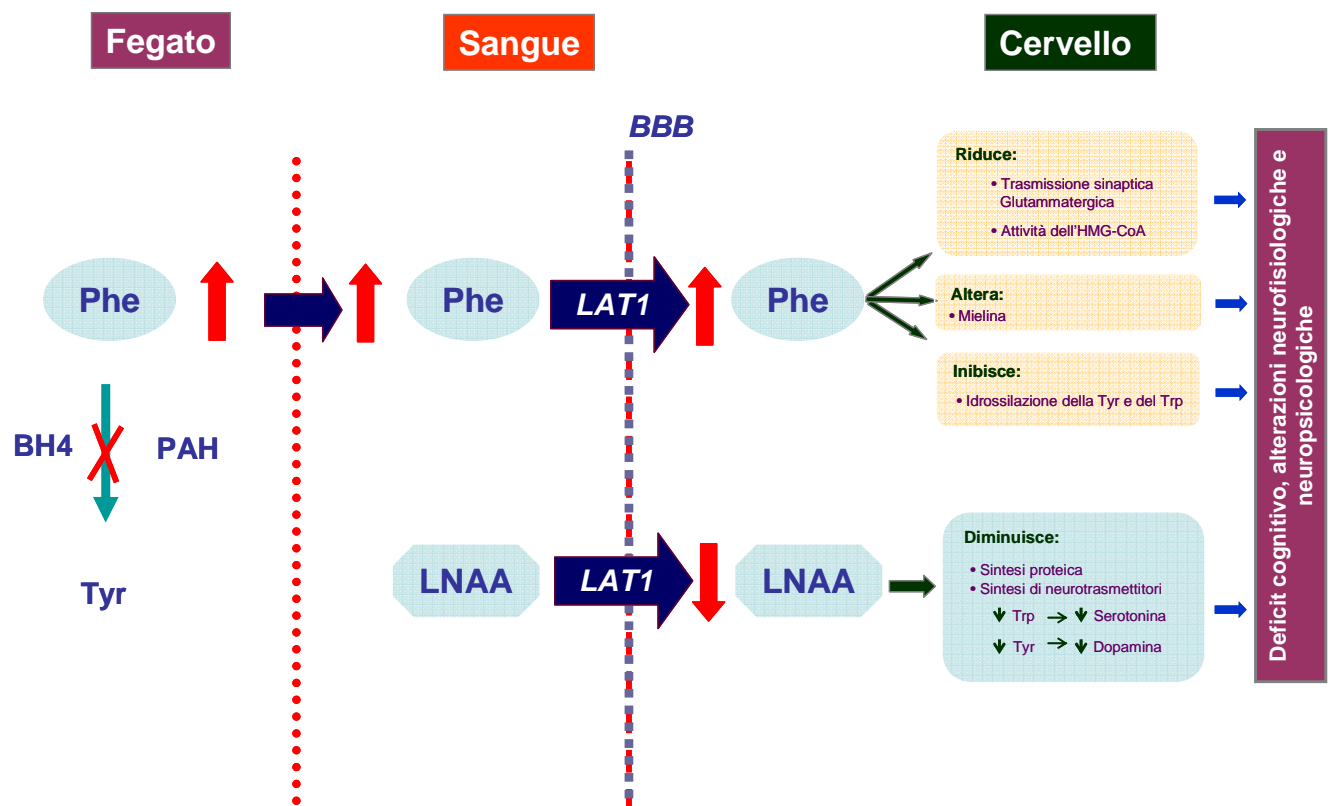
Ancora oggi, i meccanismi fisiopatologici che sono alla base delle disfunzioni cognitive descritte nei pazienti con HPA non sono ancora ben definiti. Teoricamente, le alterazioni cerebrali, potrebbero essere causate da elevate concentrazioni plasmatiche di Phe e/o da ridotti livelli ematici di tirosina. Le concentrazioni plasmatiche di tirosina non sembrano essere correlati con l'outcome cognitivo nella PKU, e la supplementazione di tirosina non è in grado di prevenire il ritardo mentale. Alcuni dati riportati in letteratura, mostrano che la iperfenilalaninemia è in grado di alterare la mielinizzazione delle fibre nervose, determinando un ritardo o una riduzione della mielinizzazione nei bambini, e una perdita di mielina negli adulti. Shefer et al. (2000) ipotizzarono che la ridotta mielinizzazione riscontrata nella PKU potrebbe essere causata da una ridotta sintesi del colesterolo. In particolare, essi osservarono che la iperfenilalaninemia era in grado di compromettere il pathway della biosintesi del colesterolo, riducendo l'attività della 3-idrossi-3-metilglutaril Coenzima A reduttasi, enzima fondamentale per la formazione del colesterolo. Un altro fattore chiave nel determinismo delle alterazioni cerebrali descritte nella PKU è l'alterata sintesi e funzionalità dei neurotrasmettitori. Bassi livelli di tirosina, secondari alla ridotta idrossilazione della fenilalanina, determinano una ridotta sintesi di dopamina (e quindi di norepinefrina), con conseguente riduzione della neurotrasmissione. Il sistema dopaminergico svolge un ruolo fondamentale nelle funzioni cognitive all'interno della corteccia pre-frontale. È noto che una disfunzione della corteccia pre-frontale può determinare una compromissione delle funzioni esecutive (incluse le funzioni cognitive) nei pazienti anziani (Huijbregts SC et al., 2002).

Inoltre, la Phe viene trasportata nel cervello mediante un trasportatore, definito trasportatore degli aminoacidi neutri (LAT1-trasportatore), che attualmente è considerato svolgere un ruolo molto importante nella patogenesi delle alterazioni cerebrali nei pazienti con PKU. LAT1 si lega in

modo selettivo agli aminoacidi neutri (valina, isoleucina, leucina, metionina, treonina, triptofano, tirosina, istidina e Phe) (Pardridge WM. 1998). Gli aminoacidi neutri si legano in modo competitivo al trasportatore LAT1. Differente è l'affinità con cui il trasportatore LAT1 si lega agli aminoacidi neutri, e la Phe presenta un'elevata affinità per il trasportatore LAT1. Pertanto, è ipotizzabile, che elevate concentrazioni plasmatiche di Phe nella PKU, determinino un marcato incremento dell'uptake della Phe dal sangue al cervello e una riduzione dell'uptake degli altri aminoacidi neutri, determinando a livello cerebrale una ulteriore ridotta disponibilità di tirosina e di tutti gli altri aminoacidi neutri. Nel cervello, il deficit di aminoacidi neutri potrebbe compromettere sia la sintesi proteica e/o la produzione dei neurotrasmettitori, e conseguentemente determinare ritardo mentale e le altre sequele neurologiche e cognitive osservate nella PKU (de Groot MJ et al., 2010). Altre evidenze sperimentali riportate in letteratura hanno mostrato che la iperfenilalaninemia potrebbe interferire con il sistema glutammatergico, fondamentale per lo sviluppo cerebrale (Martynyuk AE et al., 2005; Feillet F et al., 2010) (**Figura 4**).

In aggiunta agli effetti sul trasporto degli amminoacidi attraverso la barriera emato-encefalica, la Phe altera i pathways di idrossilazione della tirosina e decarbossilazione del triptofano con conseguente riduzione della concentrazione di dopamina e serotonina a livello del SNC.

Infine, è stato osservato che i pazienti con PKU diagnosticati precocemente (entro le prime settimane di vita trattati) e trattati in modo adeguato per lungo tempo, sembrano presentare livelli di quoziente intellettivo (IQ) più bassi rispetto alla popolazione normale (de Groot MJ et al., 2010).



**Figura 4**

**Potenziati meccanismi fisiopatologici ipotizzati del danno neurologico indotti da iperfenilalaninemia:** Phe indica fenilalanina; BBB, barriera ematoencefalica; LAT1, trasportatore di aminoacidi tipo-L; BH4, tetraidrobiopterina; HMG-CoA, 3-idrossi-3-metilglutaril-coenzima A; Tyr, tirosina; Trp, triptofano (Figura ripresa da Feillet F, 2010).

### 3.4 ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE PAH

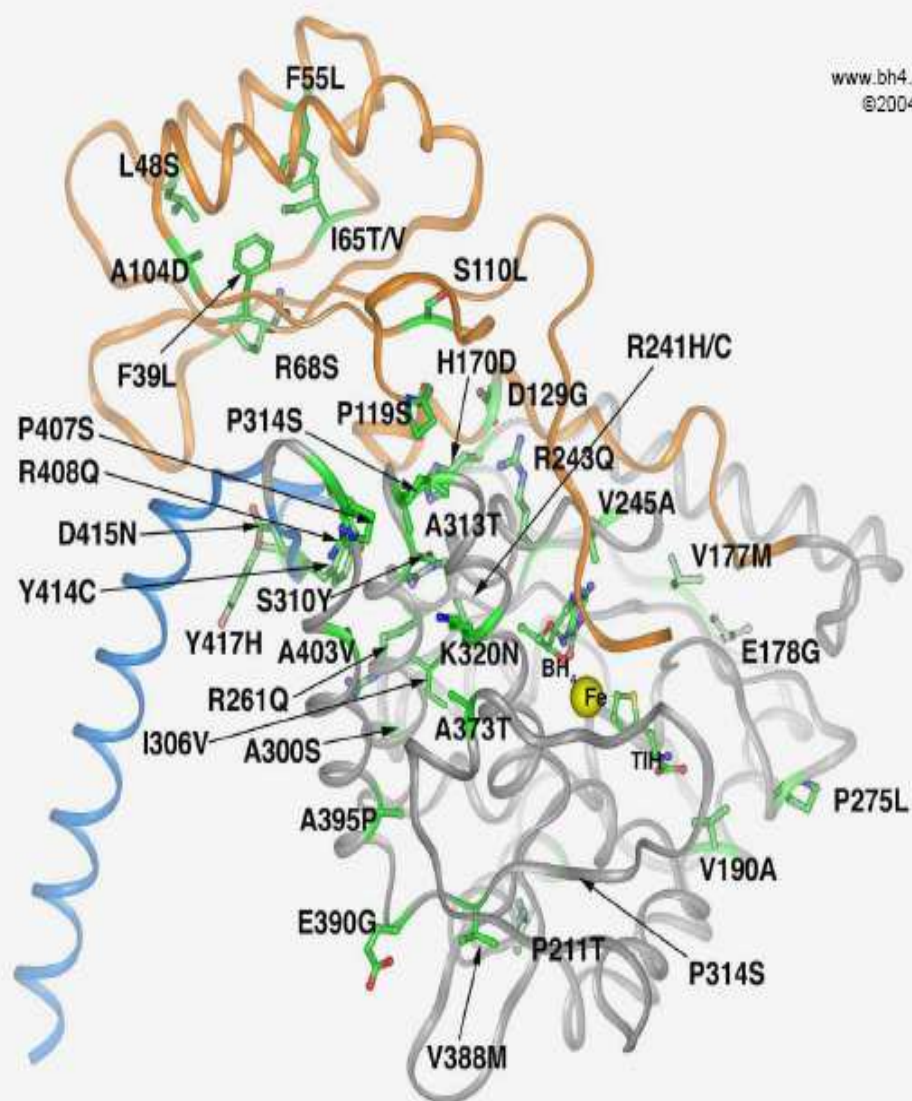
Il locus del gene della PAH è stato mappato sul braccio lungo del cromosoma 12, regione q22-q24,1; il gene è lungo 90Kb e contiene 13 esoni; ogni monomero dell'enzima PAH è di 50 Kd ed è formato da tre domini: un dominio regolatore (AA 1-142) contenente una sequenza all'N-terminale di autoregolazione, un dominio catalitico (AA 143-410) che include il sito attivo legante il ferro e il sito di legame con la BH<sub>4</sub>, ed infine un dominio di tetramerizzazione (AA 411-452) al C-terminale fondamentale per la polimerizzazione delle diverse subunità (**Figura 5**). L'attività enzimatica della PAH è regolata dal substrato (Phe) e dal cofattore (BH<sub>4</sub>) (Blau N et al., 2004); essa è maggiore se la conformazione enzimatica è omotetramerica e non omodimerica (Steinfeld R et al., 2003). Attualmente, più di 500 mutazioni sono state identificate e raccolte in un database internazionale (<http://www.mcgill.ca/pahdb>) che determinano un deficit della PAH. I difetti genetici riconosciuti sono mutazioni missenso (61%), delezioni (14%), nonsense (5%), di splicing (11%) e di frameshift (6%). Non è sempre facile riuscire a predire il fenotipo biochimico semplicemente analizzando il tipo di difetto genetico; l'ambiguità e la discrepanza genotipo-fenotipo sono più evidenti nei casi di eterozigosi, dove è possibile nella conformazione dimerica o tetramerica dell'enzima un meccanismo di complementazione allelica in vivo tra i due differenti monomeri mutati.

Molteplici sono i motivi ipotizzati della mancata correlazione genotipo-fenotipo (Kayaalp E et al., 1997):

- L'ampia eterogeneità allelica del locus della PAH è responsabile dell'elevato numero di pazienti eterozigoti e delle tante possibili interazioni tra subunità enzimatiche diverse;
- Data la possibile segregazione di più di due varianti alleliche del gene PAH all'interno della stessa famiglia, è possibile che coppie di fratelli abbiano fenotipi biochimici differenti;

- Poiché la Phe viene eliminata dal pool plasmatico attraverso la sua captazione epatica e la sua successiva idrossilazione, ci sono altri fattori, tra cui processi di transaminazione e regolazione dell'attività enzimatica, che possono determinare una variazione nell'espressione clinica della mutazione allelica;
- Variabilità biologica individuale dei valori plasmatici di Phe;
- Possibile cosegregazione di una seconda mutazione in cis su di un allele mutato influenzante il fenotipo;
- L'effetto ipotizzabile di polimorfismi allelici;
- Differenti metodi e criteri utilizzati per la diagnosi e la classificazione della HPA.

Risultati di diversi studi suggeriscono che in caso di genotipi eterozigoti la più lieve di due mutazioni è “quasi-dominante” e determina il fenotipo clinico, ciò è supportato da numerose incongruenze riportate in letteratura. È noto che allo stesso genotipo possono corrispondere varianti fenotipiche differenti; ciò è stato osservato per le mutazioni R261Q e Y414C quando presenti in omozigosi. Talvolta sono stati osservati casi di fenotipo lieve in pazienti con due mutazioni prive di attività enzimatica residua in vitro. Infine in alcuni pazienti con una forma di HPA lieve è stata evidenziata una minore tolleranza alla Phe mentre seguivano un regime dietetico appropriato e un'aumentata tolleranza alla Phe in corso di una dieta meno ristretta di Phe. In questo caso è possibile che i livelli di Phe abbiano potuto modulare l'effetto di alcune mutazioni, come dimostrato per I65T, R261Q, R158Q, L48S e Y414C frequentemente rappresentate in pazienti con discrepanze genotipo-fenotipo.



www.bh4.org/biopku.html  
©2004 by N. Blau

Blau, N. and H. Erlandsen (2004). "The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency."

## Figura 5

### Schematica rappresentazione del monomero di PAH.

Il dominio di regolazione N-terminale è colorato in arancio (residui 1-142), il dominio centrale catalitico è colorato in grigio (residui 143-410), e il dominio di tetramerizzazione C-terminale è colorato in blu (residui 411-452).



### 3.5 DIAGNOSI

Nel 1960 il microbiologo R. Guthrie, per poter diagnosticare alla nascita una condizione di HPA, inventò un test, sensibile e poco costoso, di inibizione batterica: il test di Guthrie. Per lo screening effettuato con questo tipo di test si usa un prelievo di sangue capillare adsorbito su carta da filtro e come metodo di analisi il test di inibizione microbiologico che sfrutta l'azione competitiva fra un inibitore specifico e l'aminoacido Phe sulla crescita di un microrganismo (*B. subtilis*) in terreno di coltura. L'effetto antagonista dell'aminoacido è proporzionale alla sua concentrazione per cui il metodo è semiquantitativo.

Il cut-off applicato nelle diverse sedi di screening è compreso tra 2 e 4 mg/dl (l'abbassamento della soglia a 2 mg/dl aumenta la sensibilità del test a discapito della specificità e del valore predittivo). Il prelievo viene eseguito in 3a-5a giornata di vita, quando cioè il neonato ha già assunto un certo carico proteico con l'alimentazione.

Il test di Guthrie è stato il principale strumento di screening fin dal 1960, ma solo nel 1987 una legge regionale lo ha reso obbligatorio in Campania; una legge nazionale del 1992 lo ha reso infine obbligatorio su tutto il territorio italiano.

L'introduzione dello **screening neonatale** per rilevare pazienti affetti da HPA ha consentito l'inizio precoce del trattamento dietetico a ridotto contenuto di Phe, determinando un drammatico miglioramento dell'outcome dei pazienti affetti da HPA e prevenendo le gravi sequele cliniche associate alla PKU.

Qualora rilevata una condizione biochimica di HPA, l'approfondimento diagnostico viene attuato con la determinazione quantitativa del livello plasmatico di Phe mediante cromatografia a scambio ionico su colonna. Livelli di Phe persistentemente alti possono occasionalmente comparire in neonati pre-termine o con ipertirosinemia transitoria, in bambini malati,

particolarmente dopo nutrizione parenterale con aminoacidi e in pazienti con epatopatia (dove si hanno aumentati livelli di metionina, tirosina, leucina/isoleucina e Phe). Successivamente, per ulteriore conferma diagnostica è possibile effettuare l'analisi molecolare del gene PAH. Oggi è possibile anche la diagnosi prenatale di PKU nelle famiglie che presentano altri figli affetti con mutazioni note: l'analisi molecolare può essere effettuata sul DNA isolato dai villi coriali o da colture di cellule amniotiche.

### 3.6 LA TERAPIA DIETETICA

La principale terapia della HPA è una dieta a ridotto contenuto di Phe; per essere ottimale il suo inizio deve essere precoce (entro il primo mese di vita). L'obiettivo della dieta è di mantenere le concentrazioni della Phe plasmatica entro i livelli raccomandati, per favorire una crescita e uno sviluppo normale. Tale obiettivo è possibile solo mediante l'esclusione dalla dieta di cibi ad alto contenuto proteico, che contengono quindi anche alte concentrazioni di Phe, quali ad esempio la carne, il pesce, il formaggio e le uova. Tuttavia la Phe è un aminoacido essenziale e non può essere totalmente escluso dalla dieta, pertanto la dieta prescritta deve sempre contenere piccole quantità di Phe per soddisfare le richieste plastiche dell'organismo. Per garantire un "intake" proteico sufficiente la dieta è completata con alimenti speciali a scarso contenuto di Phe e integratori di aminoacidi e micronutrienti. Nel corso del follow-up, va posta attenzione ad evitare valori plasmatici di Phe più bassi di quelli consigliati per il rischio di carenza, che soprattutto in un lattante in rapido accrescimento può condurre a gravi conseguenze (anoressia, anemia, diarrea, rash cutaneo). Il trattamento dietetico è risultato essere efficace nel prevenire danni neurologici solo se vengono mantenuti livelli plasmatici di Phe tra 2 e 6 mg/dl (National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement, 2001). Pertanto i pazienti con HPA devono essere sottoposti ad uno stretto monitoraggio della Phe plasmatica e ad un controllo periodico degli indici nutrizionali, del suo sviluppo staturo-ponderale e psicomotorio.

È riportato, in letteratura, che la mancata adesione alla dieta, in età adulta può determinare una riduzione del quoziente intellettivo, delle abilità aritmetiche, della percezione visiva, disturbi del comportamento, severe alterazioni nella sfera delle emozioni, deficit dell'attenzione, iperattività, tremori, depressione, ansietà e agorafobia (Levy HL et al., 1994). Nelle donne gravide con PKU, elevati livelli plasmatici di fenilalanina possono essere teratogeni per il feto,

determinando ritardo di crescita intrauterino, microcefalia, ritardo mentale, dimorfismi facciali e difetti cardiaci congeniti, ovvero la cosiddetta sindrome da PKU materna.

In questi ultimi anni è diventato sempre più chiaro che una dieta a ridotto contenuto di Phe deve essere continuata per tutta la vita. Dal 1993 la UK MRC (Working Party Guidelines) raccomanda che la terapia dietetica sia continuata per tutta la vita in considerazione dei numerosi casi di adulti fenilchetonurici, con scarso controllo metabolico, aventi disturbi dell'attenzione, comportamentali e neurologici e della difficoltà di riproporre un regime dietetico alle donne affette che decidono di programmare una gravidanza.

Linee guida nazionali sono state pubblicate in diverse nazioni Europee per favorire un adeguato management dei pazienti con HPA. Tutte le linee guida raccomandano che il trattamento dietetico debba essere iniziato quanto più precocemente possibile dopo la nascita, e che il monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche della Phe e la valutazione dei parametri clinici debba proseguire per tutta la vita. Mentre per quanto riguarda le concentrazioni plasmatiche di Phe raccomandate durante il trattamento dietetico, le linee guida variano nei diversi Stati (Schweitzer-krantz S et al., 2000). In Germania per esempio la German Working Group of Inborn Errors of Metabolism ha formulato nel 1997 le nuove linee-guida per il “management” dei pazienti affetti da PKU, che prevedono: dalla nascita ai 9 anni la fenilalaninemia deve essere mantenuta tra 40 e 240  $\mu\text{mol/L}$  (0,7-4 mg/dl); dopo i 9 anni e fino ai 15 anni deve essere mantenuta tra 40 e 900  $\mu\text{mol/L}$  (0,7-15 mg/dl); dopo i 15 anni il range consigliato è meno ristretto ed è compreso tra 40-1200  $\mu\text{mol/L}$  (0,7-20 mg/dl). Gli inglesi fino ai 5 anni raccomandano di mantenere livelli plasmatici di Phe compresi tra 120 e 360  $\mu\text{mol/L}$  (2-6 mg/dl), dai 6 ai 16 anni livelli compresi tra 120 e 480  $\mu\text{mol/L}$  (2-8 mg/dl), dopo i 16 anni e per il resto della vita raccomandano di mantenere livelli compresi tra 120 e 700  $\mu\text{mol/L}$  (2-11,7 mg/dl).

### 3.7 APPROCCI TERAPEUTICI ALTERNATIVI

Per molte decadi, una dieta a ridotto contenuto di fenilalanina è stata la pietra miliare per il management delle HPA. Attualmente, il trattamento dietetico, iniziato precocemente, rappresenta ancora il gold-standard terapeutico per le HPA; tuttavia la dieta comporta numerosi aspetti negativi, quali: faticosi schemi dietetici, deficit nutrizionali, uso di prodotti dietetici sgradevoli e poco palatabili al fine di favorire un adeguato intake di proteine e quindi un'adeguata crescita, problemi psicologici e riduzione della qualità di vita. La dieta nei pazienti con HPA, in particolare nei pazienti con la forma classica, è molto ristretta, e per gli adolescenti e gli adulti è difficile attenersi alle prescrizioni dietetiche per mantenere i livelli di fenilalanina plasmatica entro il range dei valori consigliati per l'età. La compliance alla dieta per tutta la vita è fondamentale per evitare danni neurologici. Si stima che, tra i pazienti con HPA, circa il 75% degli adolescenti e degli adulti, presentano una scarsa compliance alla dieta, con conseguente aumento dei livelli plasmatici di fenilalanina. Inoltre si stima che negli Stati Uniti, circa i 2/3 delle donne gravide affette da PKU non seguivano alcun schema dietetico prima di iniziare la gravidanza (Brown AS et al., 2002).

Da qui la necessità di individuare delle terapie alternative al trattamento dietetico che possano aiutare i pazienti con HPA a mantenere un adeguato controllo metabolico e migliorare la qualità di vita di questi ragazzi. Per poter migliorare l'outcome dei pazienti con HPA, approcci terapeutici alternativi sono stati studiati quali, la terapia con tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>; sapropterina) (Kure et., 1999), la supplementazione con aminoacidi neutri (LNAA) (Matalon R et al., 2006), la terapia enzimatica sostitutiva che utilizza l'enzima fenilalanina ammonio-liasi (PAL) (Sarkissian CN et al., 2008) e la terapia genica (Ding Z et al., 2008).

L'obiettivo della **terapia genica** è quello di reinstaurare permanentemente l'espressione della PAH nel fegato, purtroppo tutti gli esperimenti provati sul topo sono falliti per vari motivi: scarsa espressione genica, produzione di

anticorpi neutralizzanti e la mancanza del cofattore in organi target non epatici. Il trapianto epatico potrebbe correggere pienamente il deficit della PAH ma il rischio dell'intervento chirurgico e della successiva terapia immunosoppressiva non lo rendono una terapia alternativa al trattamento dietetico (Harding CO & Gibson KM, 2010).

Un aumentato interesse per la *terapia enzimatica sostitutiva* sta emergendo in molte malattie metaboliche ed anche per la PKU; il sistema enzimatico sperimentato è la fenilalanina ammonio-liasi (PAL, EC 4.3.1.5). Tale enzima converte la Phe senza necessità del cofattore ed il prodotto della reazione è l'acido trans-cinnamico (sostanza con bassissima tossicità) convertito nel fegato ad acido benzoico, il quale è poi escreto con le urine principalmente sotto forma di ippurato (Kim W e al., 2004). Sebbene la somministrazione orale sia più accettata dal paziente, essa è gravata dalla reazione di proteolisi indotta dall'acidità gastrica e dagli enzimi intestinali, superata solo in parte da varie tecniche di incapsulamento dell'enzima. Per questo motivo è stata presa in considerazione la via di somministrazione parenterale anche se un grosso ostacolo per questa modalità di trattamento è rappresentato dalla immunoreattività della PAL. Per superare questo inconveniente il metodo della PEGylation è stato applicato anche per la PAL (Gamez A et al., 2007).

Recenti studi hanno dimostrato l'efficacia terapeutica di una *miscela di aminoacidi neutri* di nei pazienti con HPA (Matalon R et al., 2003). Come indicato sopra, gli amminoacidi neutri utilizzano, per attraversare la mucosa intestinale, un carrier molto simile a quello utilizzato per superare la barriera emato-encefalica; il loro effetto nel ridurre la fenilalaninemia è determinato da un meccanismo di competizione con la Phe a livello di questi carriers (Matalon R et al., 2006).

Recenti studi sono a favore di un possibile ruolo della **BH<sub>4</sub>** nel trattamento di un gruppo di pazienti con HPA da deficit della PAH. L'effetto della somministrazione di BH<sub>4</sub> esogena risulta in un aumento della tolleranza alla Phe e in un miglioramento del controllo metabolico sia in pazienti con HPA lieve che in un considerevole numero di ragazzi con un fenotipo più severo. Il

genotipo della PAH e l'attività enzimatica residua sono considerati predittori utili della sensibilità alla BH<sub>4</sub>.

### 3.8 LA TETRAIDROBIOPTERINA (BH<sub>4</sub>)

La tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), cofattore degli enzimi che idrossilano gli amminoacidi aromatici, è importante nel catabolismo della Phe, Tirosina e Triptofano e nella biosintesi della dopamina e serotonina. La dieta a ristretto contenuto di Phe, ha rappresentato per anni l'unica terapia efficace nel prevenire tutte le complicanze che comporta la HPA; purtroppo la dieta è gravata da enormi problemi psicologici e da scarsa compliance soprattutto a partire dal periodo adolescenziale. Da diversi anni, spinti dalla necessità di sperimentare nuovi approcci terapeutici, numerosi studi hanno sperimentato l'efficacia e la tollerabilità della BH<sub>4</sub>. Nel 1975 Milstein e Kaufman per la prima volta ipotizzarono un possibile uso della BH<sub>4</sub> per il trattamento della HPA, in pazienti con attività enzimatica residua, in quanto la BH<sub>4</sub> poteva stimolare l'attività della PAH. Nel 1999, Kure e collaboratori (Kure et., 1999), trovarono una riduzione dei livelli di fenilalanina plasmatica in seguito alla somministrazione per via orale di BH<sub>4</sub> in pazienti con lieve HPA. In questo studio furono analizzati 5 pazienti con mild-PKU a dieta libera. In quattro pazienti, dopo il carico con BH<sub>4</sub>, si assisteva ad una riduzione del 40-70% delle concentrazioni plasmatiche della fenilalanina. Tale risposta fu piuttosto sorprendente, poiché i pazienti con HPA presentano livelli normali di BH<sub>4</sub> nel sangue e nelle urine. Successivamente, numerosi altri studi hanno confermato tali dati, aprendo in tal modo nuove prospettive terapeutiche nel trattamento delle HPA. Studi successivi, hanno mostrato che la BH<sub>4</sub> è in grado di attivare l'attività enzimatica residua della PAH e in tal modo migliorare, seppur parzialmente, il metabolismo ossidativo della Phe in una proporzione significativa di pazienti con PKU (Muntau et al., 2002; Muntau AC & Gersting SW, 2010). Le basi della responsività alla BH<sub>4</sub> potrebbero essere correlati a differenti meccanismi molecolari. Numerose ipotesi sono state formulate per spiegare la sensibilità alla BH<sub>4</sub>, tuttavia i meccanismi molecolari che sono alla base della responsività alla BH<sub>4</sub> non sono ancora



ben definiti. Attualmente, i possibili meccanismi responsabili della BH<sub>4</sub> responsività sono:

- La ridotta affinità di legame con la BH<sub>4</sub> (e quindi l'aumento della K<sub>m</sub> enzimatica) dovuta a mutazioni localizzate in corrispondenza delle regioni leganti il cofattore (CBR) può essere corretta aumentando le concentrazioni del cofattore attraverso la sua supplementazione orale. Esempi di questo tipo di mutazioni sono: V245A, R252W, R261Q, R261X localizzate nella regione CBR1; E280K, P281S e P281L localizzate nella regione CBR2.
- La BH<sub>4</sub> induce l'espressione genica della PAH, dato questo osservato per le mutazioni presenti nel dominio di regolazione N-terminale (L48S);
- La BH<sub>4</sub> aumenta la stabilità dell'enzima (omopolimerico ed eteropolimerico) nel caso in cui i genotipi abbiano una o due mutazioni missenso localizzate nel dominio C-terminale di tetramerizzazione (Y414C, A309V e V388M); la BH<sub>4</sub> potrebbe favorire la conformazione dimerica che pur avendo un'attività catalitica più bassa viene degradata più lentamente.
- Azione della BH<sub>4</sub> come chaperone farmacologico e prevenzione del “*misfolding*” dell'enzima PAH. Alcune mutazioni della PAH, in particolare mutazioni di tipo missense, descritte come potenzialmente responsive, determinano un alterato *folding* della proteina; la BH<sub>4</sub> potrebbe influenzare la struttura terziaria e quaternaria dell'enzima mutato conferendogli un'aumentata attività residua (Muntau AC & Gersting SW, 2010). Mutazioni genetiche, in particolar modo mutazioni missense, determinano la produzione di proteina *misfolding* con conseguente perdita di funzione, in quanto tali mutazioni riducono la stabilità della proteina, aumentano la degradazione della proteina determinando in tal modo una riduzione delle concentrazioni dell'enzima funzionale nelle cellule (Muntau AC & Gersting SW, 2010). Sulla base degli studi effettuati da

Muntau AC, tale meccanismo sembrerebbe essere il principale meccanismo molecolare alla base della responsività alla BH<sub>4</sub> (Muntau AC & Gersting SW, 2010). Infatti Muntau AC & Gersting SW, hanno dimostrato che la somministrazione di dosi farmacologiche di BH<sub>4</sub>, è in grado di ripristinare la funzione dell'enzima PAH, attraverso una correzione del *misfoldnfig* della PAH. È stato osservato inoltre che, il legame del cofattore alla PAH in assenza o prima del legame con la Phe inibisce la sua tetramerizzazione e favorisce la formazione del dimero a più bassa attività, ma con maggiore stabilità (Steinfeld R et al., 2003).

- Azione stabilizzante della BH<sub>4</sub> sull'mRNA

La responsività alla BH<sub>4</sub> potrebbe essere associata a mutazioni nel gene della PAH che determinano la formazione di forme varianti dell'enzima con attività enzimatica residua. Numerose evidenze scientifiche riportate in letteratura, hanno mostrato che vi sono mutazioni genetiche predittive della responsività alla BH<sub>4</sub>. Molte mutazioni sono state caratterizzate e definite come responsive o potenzialmente responsive sulla base dell'attività enzimatica residua e del test da carico in vivo. Fino a pochi anni fa, il test da carico con BH<sub>4</sub>, era tradizionalmente utilizzato per diagnosticare una forma di HPA dovuta al deficit del cofattore, caratterizzato da un rapido abbassamento dei livelli plasmatici di Phe dopo la sua somministrazione. Oggi esso è diventato un valido strumento per identificare i pazienti che possono beneficiare della supplementazione con BH<sub>4</sub>. Attualmente, più di 500 mutazioni sono state identificate e raccolte in un database internazionale (<http://www.mcgill.ca/pahdb>) che determinano un deficit della PAH. A tal proposito, è stato creato un database internazionale sulle mutazioni identificate come potenzialmente responsive al trattamento con tetraidrobiopterina (<http://www.bh4.org/BH4DatabaseBiopku.asp>). Tuttavia, il ruolo delle mutazioni nel gene della PAH come parametro predittivo per la responsività alla BH<sub>4</sub> è ancora oggi, oggetto di dibattito. Infatti, alcuni lavori

mostrano dati contrastanti sulla correlazione tra il genotipo e la responsività alla BH<sub>4</sub> (Zurflüh MR et al., 2008). Come riportato in letteratura, in alcuni trial clinici, pazienti portatori di mutazioni severe nel gene della PAH, sono risultati responsivi alla BH<sub>4</sub> (Fiege B et al., 2007). La responsività alla BH<sub>4</sub> varia nei differenti pazienti, e l'associazione di due mutazioni lievi non sempre determina una risposta migliore alla BH<sub>4</sub> (Trefz FK et al., 2009). In particolare, Trefz F.K. e collaboratori, riportavano che pazienti con PKU portatori di mutazioni nel dominio regolatore mostravano una risposta alla BH<sub>4</sub> molto eterogenea. Circa 85% dei pazienti con PKU sono composti eterozigoti per due differenti mutazioni, contribuendo in tal modo alla eterogeneità clinica e biochimica della malattia. Come riportato da Lindner et al., (2003), vi sono pazienti con genotipo identico che mostrano una risposta discordante al test da carico con BH<sub>4</sub>, suggerendo che in questi pazienti, la variabilità nella risposta al carico con BH<sub>4</sub> potrebbe dipendere da fattori esterni, quali l'assorbimento intestinale della BH<sub>4</sub> oppure da altre componenti genetiche (quali il polimorfismo intragenico, geni modificatori). Pertanto, l'analisi delle mutazioni può essere importante per identificare i pazienti che potenzialmente potrebbero essere responsivi alla BH<sub>4</sub>, ma la responsività alla BH<sub>4</sub> può essere valutata con certezza solo con il challenge con BH<sub>4</sub>. Ulteriori studi in vitro sono necessari per meglio definire la correlazione genotipo-fenotipo in pazienti con HPA responsivi alla BH<sub>4</sub>. Precedenti studi, hanno dimostrato che la farmacocinetica della BH<sub>4</sub>, presenta un'alta variabilità intra-individuale ed inter-individuale (Fiege B et al., 2004; Zurflüh MR et al 2005). Ad oggi, i meccanismi che sottendono l'ampia variabilità nel metabolismo della BH<sub>4</sub> non sono completamente definiti.

Fino al 2007, la BH<sub>4</sub> era disponibile solo per scopi di ricerca, limitandone in tal modo l'uso per il trattamento della PKU. Sulla base delle diverse evidenze scientifiche riportate in letteratura sulla efficacia e sulla sicurezza della sapropterina dicloridrato (6R-BH<sub>4</sub>), a dicembre del 2007, la Food and Drug Administration (FDA) ha autorizzato la commercializzazione della sapropterina dicloridrato, una formulazione sintetica attiva della BH<sub>4</sub> e molto

più stabile a temperatura ambiente, nota con il nome di KUVAN (Kuvan®, BioMarin Corporation, Tiburon, CA) per uso clinico. A dicembre del 2008, anche in Europa il Kuvan ha ricevuto l'autorizzazione all'immissione in commercio con indicazione al trattamento di pazienti con HPA di età  $\geq 4$  anni, che sono risultati responsivi a tale trattamento. Dal 15 Settembre 2009, il Kuvan è ufficialmente disponibile anche in Italia. In Italia, Kuvan è l'unico farmaco approvato per il trattamento dell'iperfenilalaninemia (HPA) dovuta a fenilchetonuria (PKU). Sulla base di dati disponibili di trial di Fase 2 e di Fase 3, la sapropterina dicloridrato appare essere sicura e ben tollerata (Levy HL et al., 2007; Burton BK et al., 2007; Hegge KA et al., 2009; Trefz FK et al., 2009; Somaraju UR, et al., 2010). Gli effetti collaterali più comunemente riportati in letteratura sono: rinorrea (21 %), cefalea (21 %), tosse (15%), dolore faringo-laringeo (12 %), diarrea (12 %), vomito (12%) e dolore addominale (Trefz FK et al., 2009). Dati limitati esistono sulla somministrazione della sapropterina dicloridrato in neonati e bambini di età  $< 8$  anni, in gravidanza o in pazienti con alterazione della funzionalità epatica o renale. In particolare, al momento non sono disponibili studi clinici sull'uso della sapropterina in gravidanza, ma in studi condotti su animali non è stato osservato alcun effetto dannoso diretto o indiretto sulla madre o sul feto. Pertanto la sapropterina potrebbe rappresentare un valido e promettente opzione terapeutica per le donne in gravidanza. Il dosaggio iniziale indicato è di 10 mg/Kg una volta al giorno. Se dopo un mese di trattamento nessun miglioramento biochimico viene osservato, la dose può essere aumentata fino ad un massimo di 20 mg/Kg al giorno. Nei pazienti responsivi, la dose di mantenimento può variare tra 5-20 mg/Kg in un'unica somministrazione al giorno. Se, durante il periodo di trattamento, non si osserva alcun miglioramento delle concentrazioni plasmatiche di Phe, la sapropterina può essere sospesa. La sapropterina dicloridrato (Kuvan) è disponibile in forma di compresse da 100 mg. Le compresse possono essere somministrate intere o diluite in 120-240 ml di acqua o di succo di mela; dopo che le compresse sono state diluite, devono essere somministrate entro 15 minuti. Le

compresse contengono acido ascorbico al fine di preservare lo stato di riduzione della sapropterina e di consentirne la conservazione a temperatura ambiente.

Nel 2007, Levy et al., hanno proposto un razionale algoritmo per valutare la responsività alla sapropterina (Levy H et al., 2007), alle cui raccomandazioni si rimanda. La responsività alla sapropterina è definita, arbitrariamente, come una riduzione  $\geq 30\%$  dei livelli ematici di fenilalanina entro le 24 ore dopo la somministrazione della  $BH_4$ . Mentre una riduzione del 10-29% è indicativa di parziale responsività alla  $BH_4$ . Tale algoritmo valuta sia la risposta a breve termine in seguito alla somministrazione di  $BH_4$  e sia l'efficacia a lungo termine del trattamento con sapropterina. In questo algoritmo, la concentrazione plasmatica di fenilalanina viene valutata prima della somministrazione della sapropterina e dopo 1 giorno, e successivamente dopo 7, 14 e 28 giorni la somministrazione della sapropterina al dosaggio di 20 mg/Kg. Nel corso dei 28 giorni di trattamento con la sapropterina, se i livelli di fenilalanina scendono al di sotto del range di riferimento per età, il dosaggio della sapropterina può essere ridotto oppure è possibile incrementare l'apporto di fenilalanina con la dieta. È stata osservata una correlazione tra la dose utilizzata e il grado di risposta alla  $BH_4$ , infatti una maggiore riduzione dei livelli ematici di fenilalanina è stata evidenziata nei pazienti trattati con il dosaggio di 20 mg/kg/die. Tuttavia il dosaggio della sapropterina dicloridrato può variare, tra 5 e 20 mg/Kg/die al fine di raggiungere e conservare livelli ematici adeguati di fenilalanina. Ad oggi, solo un piccolo numero di pazienti e solo per brevi periodi sono stati trattati con la sapropterina, pertanto ulteriori studi sono necessari per stabilirne la sicurezza e l'efficacia a lungo termine. Il principale problema del trattamento con  $BH_4$  è il suo alto costo. Olti sono i punti ancora poco chiari circa il protocollo e l'interpretazione del test da carico. Inoltre sono necessari ancora dei trials che provino la biodisponibilità e gli effetti a lungo termine della terapia con  $BH_4$  nei pazienti con deficit della PAH.

### 3.9 SCOPO DELLO STUDIO

Quello che noi ci proponiamo con questo studio è:

- Tipizzare, sotto il profilo genetico, i pazienti seguiti presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università "Federico II" di Napoli, affetti da HPA.
- Sottoporre questi pazienti a carico orale con BH<sub>4</sub> per testarne la eventuale responsività.
- Mettere in correlazione l'eventuale risposta al carico orale con BH<sub>4</sub> al pattern genotipico.
- Verificare la sicurezza a lungo termine del trattamento con BH<sub>4</sub>.

### 3.10 PAZIENTI E METODI

Un totale di 63 pazienti sono stati inclusi nello studio, di cui 26 femmine e 37 maschi, (con un range di età compreso tra 4 e 27 anni e una media di 17 anni) seguiti presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università Federico II di Napoli, affetti da HPA. In tutti i pazienti era stato escluso un deficit di sintesi o della rigenerazione della BH<sub>4</sub>. Le coppie di fratelli, presenti nella casistica, sono in numero di 10. In questi casi il sospetto diagnostico posto dopo la diagnosi di HPA del fratello minore è stato confermato dall'analisi molecolare del gene PAH.

Cinquantasette pazienti sono stati diagnosticati durante il periodo neonatale mediante lo screening e trattati precocemente con adeguata terapia dietetica.

Nei pazienti risultati positivi al test di inibizione batterica di Guthrie, la diagnosi definitiva, è stata ottenuta mediante la valutazione quantitativa della Phe plasmatica, utilizzando metodiche quali la cromatografia liquida ad alta precisione (HPLC) o la cromatografia su colonna con resina a scambio ionico (amino acid-analyser).

In sei pazienti la diagnosi è stata posta tardivamente, poiché essi sono nati prima che lo screening neonatale divenisse obbligatorio su tutto il territorio italiano:

1. B.AN., che presenta una mild PKU, la diagnosi è stata posta all'età di 8 anni (QI = 68);
2. G.N., con mild PKU, la diagnosi è stata posta all'età di 6 anni e 10 mesi (QI = 110);
3. M.N., che presenta una PKU classica, è stata diagnosticata all'età di 10 anni (QI = 32);
4. P.A., che presenta una HPA tipo III, la diagnosi è stata posta all'età di 4 anni (QI = 100).

In questi quattro casi il sospetto diagnostico, posto dopo la diagnosi di HPA dei fratelli minori, è stato confermato dall'analisi molecolare del gene PAH.

5. In un solo paziente (P.R.) che presenta una PKU classica la diagnosi è stata posta all'età di 2 anni dopo la presentazione clinica di un grave ritardo mentale.
6. Nella paziente V.R., la diagnosi è stata posta all'età di 16 anni. La paziente è stata classificata come una HPA tipo III, pur avendo avuto una fenilalaninemia alla diagnosi di 25 mg/dl, in quanto presentava una buona tolleranza alla Phe, pari a 630 mg/die. Attualmente la ragazza presenta lieve ritardo dello sviluppo psicomotorio (QI=56) e disturbi del comportamento.

I pazienti fin dalla nascita sono stati seguiti in regime di Day Hospital con controlli inizialmente settimanali nel corso del primo anno di vita, successivamente semestrali, in aggiunta a controlli ambulatoriali mensili della fenilalaninemia. Ad ogni controllo sono stati valutati gli indici auxologici, i parametri ematochimici con particolare attenzione all'aminoacidemia e la "compliance" al trattamento dietetico. Ogni valore della Phe plasmatica veniva comunicato alla dietista che, in relazione alla tolleranza individuale, modificava la dieta. La *tolleranza* è stata espressa in mg/die ed intesa come l'intake giornaliero di Phe in grado di mantenere valori di fenilalaninemia compresi tra 2 e 6 mg/dl. Durante ogni consulenza nutrizionale è stata praticata un'accurata anamnesi dietetica, sempre dallo stesso operatore, volta ad individuare l'intake di Phe, di calorie e di proteine. La dieta a ridotto contenuto di Phe, ipoproteica e normocalorica, è stata costruita riducendo l'apporto di proteine naturali, integrando con opportune miscele di aminoacidi prive di Phe e coprendo i fabbisogni di vitamine e sali minerali.

Tutti i pazienti, o i genitori dei pazienti con età inferiore a 18 anni, hanno firmato il consenso informato per la partecipazione allo studio (sia per l'analisi molecolare del gene PAH e sia per il test da carico con BH<sub>4</sub>).



### ***3.10.1 Analisi del fenotipo biochimico***

I pazienti sono stati divisi in tre diverse classi fenotipiche sulla base del valore di fenilalaninemia riscontrato alla diagnosi e della tolleranza alla Phe. La tolleranza è stata calcolata a partire dai 5 anni di età; solo nel caso in cui il bambino era più piccolo di 5 anni è stata calcolata a partire dai 2 anni di età.

### ***3.10.2 Analisi mutazionale del gene PAH e delle frequenze genotipiche***

In tutti i pazienti, l'estrazione del DNA genomico da sangue intero è stato ottenuto secondo la metodica del "salting out" descritta da Miller e collaboratori (1988) (Miller SA et al., 1988).

L'analisi molecolare del gene PAH, praticata presso il Centro di Ricerca CEINGE dell'Università Federico II di Napoli, è stata effettuata mediante sequenziamento diretto.

### ***3.10.3 Valutazione della BH<sub>4</sub>-responsività***

Per selezionare i pazienti che avrebbero potuto beneficiare della supplementazione con BH<sub>4</sub> è stato effettuato un test da carico con BH<sub>4</sub> che valuta la sensibilità al cofattore esogeno sulla base della riduzione percentuale della fenilalaninemia.

**Criteri di inclusione:** I pazienti candidati al test sono stati selezionati sulla base del genotipo, del fenotipo (dando la preferenza a quelli più lievi), della compliance dietetica (scegliendo pazienti con scarso controllo metabolico) e dell'età (preferendo il periodo adolescenziale).

Inizialmente sono stati arruolati per il test da carico con BH<sub>4</sub> tutti quei pazienti in età adolescenziale con scarsa compliance e con una Phe plasmatica compresa tra 8 e 20 mg/dl.

**Criteri di esclusione** sono stati: la gravidanza o l'allattamento per le donne, malattie neuropsichiatriche e malattie croniche (es. epilessie, etc).

Per effettuare il test da carico nei pazienti selezionati, è stato formulato, con lo scopo di standardizzare la procedura, un protocollo illustrato dal medico attraverso un colloquio informativo al paziente e alla sua famiglia. I pazienti hanno seguito una dieta con una quantità di Phe distribuita uniformemente nei tre pasti principali (colazione, pranzo, cena; un'eventuale merenda comprendeva alimenti senza Phe); tale dieta è stata prescritta per le due settimane antecedenti il test da carico e per tutta la durata del test stesso. Durante la settimana antecedente il test sono stati praticati due prelievi venosi (a distanza di almeno due giorni) per il dosaggio della Phe plasmatica allo scopo di verificare l'omogeneità dei valori e la compliance allo schema dietetico. La massima variabilità tollerata tra i due valori di fenilalaninemia è stata del 15%. Il test è stato praticato in regime di ricovero mediante la somministrazione di compresse di BH<sub>4</sub> (Schircks Laboratories, Zurigo-Svizzera) al dosaggio di 20 mg/Kg in due somministrazioni (T<sub>0</sub> e T<sub>24</sub>) dopo

digiuno notturno. Il farmaco è stato assunto, come indicato nella scheda tecnica del farmaco, in un tempo massimo di 30 minuti; i prelievi venosi, per il dosaggio plasmatico della Phe e della tirosina sono stati effettuati ai tempi: 0; 4; 8; 12; 24; 32; 48 ore.

I risultati del test da carico sono stati interpretati secondo le indicazioni di Fiege e collaboratori (Fiege B et al., 2005) nel modo seguente:

- **Rapid responder:** riduzione della Phe plasmatica  $\geq 30\%$  al  $T_8$ ;  $\geq 50\%$  a  $T_{24}$  e/o  $T_{48}$ ;
- **Moderate responder:** riduzione della Phe plasmatica  $\geq 20\%$  al  $T_8$ ;  $\geq 30\%$  a  $T_{24}$ ;  $\geq 50\%$  a  $T_{48}$ ;
- **Slow responder:** riduzione della Phe plasmatica  $<20\%$  a  $T_8$ ;  $\geq 20\%$  a  $T_{24}$ ;  $\geq 30\%$  a  $T_{48}$ .

### ***3.10.4 Terapia a lungo termine con BH<sub>4</sub>***

Tutti i pazienti risultati responsivi al test da carico con BH<sub>4</sub>, hanno iniziato il trattamento a lungo termine con BH<sub>4</sub> al dosaggio di 10 mg/Kg/die, suddiviso in 3 somministrazioni.

Ogni settimana, è stato effettuato il dosaggio della Phe plasmatica, e se il valore ottenuto era nei limiti, veniva effettuato un incremento dell'intake di Phe pari a 200 mg di Phe/die

## 3.11 RISULTATI

### 3.11.1 *Fenotipo biochimico*

Dei sessantatre pazienti con HPA inclusi nello studio, 28 presentano una PKU classica, 20 una mild PKU e 15 una MHP (**Tabella 1**). Per sette pazienti (pazienti AD, AG, BA, DV, ES, MG e VC), nei quali il livello di Phe alla diagnosi è risultata in disaccordo con il valore di tolleranza alla Phe, la classificazione fenotipica è stata stabilita sulla base della “*tolleranza dietetica*” poiché i livelli di Phe alla diagnosi potrebbero essere stati influenzati da alcuni eventi perinatali, quali l’ipercatabolismo (per es. per cause infettive).

**Tabella 1 - Genotipo e fenotipo biochimico dei pazienti arruolati nello studio (I parte)**

	<i>Paziente</i>	<i>Età attuale (anni)</i>	<i>Fenotipo biochimico</i>	<i>PHE alla dx (mg/dl)</i>	<i>Tolleranza (mg/die)</i>	<i>Genotipo</i>	
						<i>Allele 1</i>	<i>Allele 2</i>
1	A. S.	25	cPKU	64	360	R261Q*	Non nota
2	C. B.	17	cPKU	22	300	R261Q*	L48S*
3	C. E.	10	cPKU	20	280	R252W	R252W
4	C. N.	19	cPKU	38.6	Non valutabile	IVS10nt11G>A	IVS10nt11G>A
5	C.M.P	8	cPKU	25.5	150	IVS10nt11G>A	IVS10nt11G>A
6	C. P.	18	cPKU	36	320	R261X	IVS10nt11G>A
7	D.C.A	18	cPKU	47.5	300	R176X	R158Q*
8	D.L.P	11	cPKU	22	420	L48S*	R158Q*
9	D. R. R.	15	cPKU	Non noto	280	R252W	R408W
10	D. L. V.	22	cPKU	30	Non valutabile	L48S*	R158Q*
11	E. G.	19	cPKU	27.7	350	R261Q*	IVS10nt-11G>A
12	F. G.	12	cPKU	31	325	R261Q*	P281L
13	F. V.	16	cPKU	21	280	R261Q*	P281L
14	G. F.	19	cPKU	67.6	300	1055delG	1055delG
15	I. A.	16	cPKU	41,8	275	R243X	IVS10nt-11G>A
16	I. R.	21	cPKU	35.5	350	R261Q*	IVS07nt3G>C
17	M. C.	15	cPKU	28	340	R261Q*	IVS10nt-11G>A
18	M. M.	17	cPKU	29.1	270	R261Q*	R261Q*
19	M. N.	25	cPKU	24	Non valutabile	R261Q*	IVS10nt-11G>A
20	M. F.	16	cPKU	30	400	P281L	Non nota
21	M. R.	22	cPKU	30	265	R261Q*	IVS10nt-11G>A
22	N. A.	27	cPKU	32	310	IVS10nt-11G>A	E280K
23	P. A.	21	cPKU	80	340	c.592_613del22	c.592_613del22
24	P. M. C.	21	cPKU	32	330	L213P	IVS10nt-11G>A
25	P. R.	25	cPKU	34	Non valutabile	L213P	IVS10nt-11G>A
26	R. R.	21	cPKU	46.8	350	R261X	IVS10nt11G>A
27	S. A.	19	cPKU	25	200	1055delG	1055delG

\* **Mutazione BH4-responsive**; DL = dieta libera

**Tabella 1 - Genotipo e fenotipo biochimico dei pazienti arruolati nello studio (II parte)**

	<i>Paziente</i>	<i>Età attuale (anni)</i>	<i>Fenotipo biochimico</i>	<i>PHE alla dx (mg/dl)</i>	<i>Tolleranza (mg/die)</i>	<i>Genotipo</i>	
						<i>Allele 1</i>	<i>Allele 2</i>
28	S. I.	15	cPKU	51	230	IVS10nt-11G>A	IVS10nt-11G>A
29	A. D.	25	mPKU	>20	550	R261Q*	1055delG
30	A. G.	25	mPKU	>20	550	R261Q*	1055delG
31	B. A.	22	mPKU	31	440	R261Q*	IVS10nt-11G>A
32	B.AN.	27	mPKU	20	395	R261Q*	P281L
33	B. C.	20	mPKU	19.6	400	R261Q*	R158Q*
34	B. P.	19	mPKU	20	480	R261Q*	P281L
35	D. D.F	6	mPKU	18	330	S67P	1056del.G
36	D. M.	17	mPKU	18	395	R261Q*	P281L
37	D. N.	17	mPKU	6	505	L48S*	R158Q*
38	E. S.	20	mPKU	30	505	W187X	P281L
39	G. L.	21	mPKU	11.6	500	165delT	P366H
40	M. G.	9	mPKU	35	385	L48S*	Q301P
41	M. GE.	5	mPKU	9	200	R261Q*	L48S*
42	P. A.	14	mPKU	19.3	410	R261Q*	R261Q*
43	R. A.	9	mPKU	20	230	IVS10nt-11G>A	P281L
44	R. M.	16	mPKU	18	400	IVS10nt-11G>A	Y414C*
45	P. F.	14	mPKU	20	390	IVS10nt-11G>A	116-118delTCT
46	V. E.	15	mPKU	4	450	L48S*	D222G*
47	V.F.B	24	mPKU	16.3	500	284-286delTCA	165delT
48	V.G.V	13	mPKU	20	400	IVS10nt-11G>A	R158Q*
49	A. A.	4	MHP	6	650	E390G	Non nota
50	C. F.	7	MHP	4.2	DL	A403V*	R241C*

\* **Mutazione BH4-responsive**; DL = dieta libera



**Tabella 1 - Genotipo e fenotipo biochimico dei pazienti arruolati nello studio (II Iparte)**

	<i>Paziente</i>	<i>Età attuale (anni)</i>	<i>Fenotipo biochimico</i>	<i>PHE alla dx (mg/dl)</i>	<i>Tolleranza (mg/die)</i>	<i>Genotipo</i>	
						<i>Allele 1</i>	<i>Allele 2</i>
51	D.P.C	20	MHP	4	DL	L48S*	A403V*
52	D. V.	22	MHP	36.8	650	L48S*	R158Q*
53	F. P.	9	MHP	5.5	600	I94S	I94S
54	G. C.	10	MHP	> 6	DL	165delT	N223Y
55	G. D.	14	MHP	7	DL	I306V	Non nota
56	G. N.	25	MHP	20	1920	165delT	P366H
57	M. T.	19	MHP	8.2	DL	W187X	T418I
58	P. A.	17	MHP	11.8	1500	R158Q*	D338Y*
59	P. L.	13	MHP	6	500	R158Q*	D338Y*
60	R. A.	19	MHP	10	DL	R261Q*	R408Q*
61	V. C.	21	MHP	15	1100	R261Q*	L48S*
62	V. G.	9	MHP	5.4	DL	N223Y	Non nota
63	V. R.	27	MHP	25	630	IVS06nt-2delA	P281L

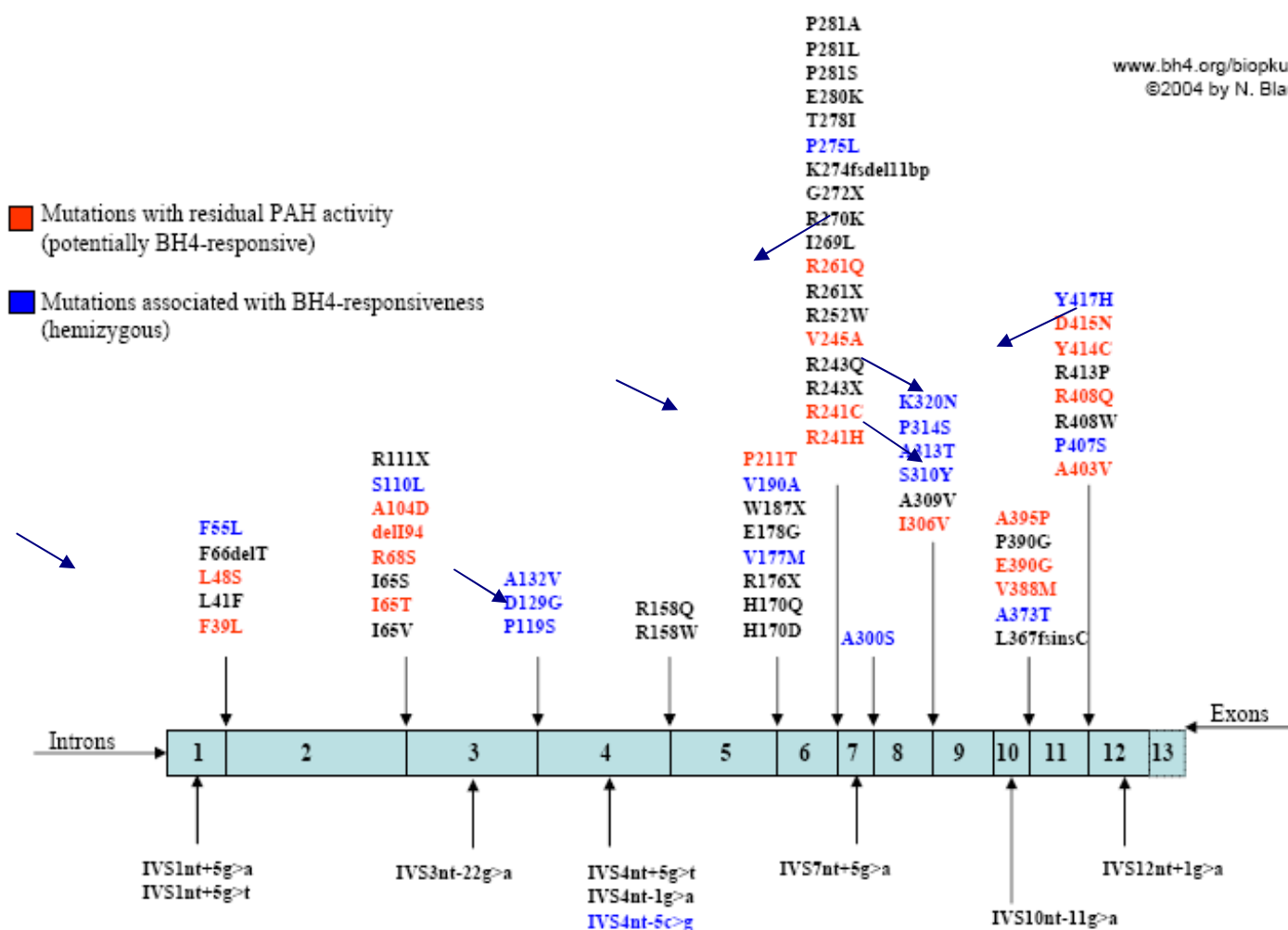
\* **Mutazione BH4-responsive**; DL = dieta libera

### 3.11.2 Genotipo

L'analisi molecolare per la ricerca di mutazioni nel gene PAH è stata effettuata in tutti i 63 pazienti arruolati nello studio. In 5 pazienti è stato riconosciuto un solo allele mutato. Dei 58 genotipi disponibili, 49 pazienti erano eterozigoti composti e 9 pazienti sono risultati omozigoti (**Tabella 1**). Un totale di 36 mutazioni differenti sono state identificate, distribuite lungo tutta la sequenza del gene PAH (**Tabella 1**). Di queste 36 distinte mutazioni, 23 erano mutazioni missense (64%), sette erano delezioni (19.4%), quattro erano mutazioni non-sense (11%) e due erano localizzate nei siti di splicing (5.5%). Le mutazioni più frequentemente ritrovate sono la R261Q (la cui frequenza è risultata pari al 36%) e la IVS10nt11G>A (la cui frequenza era pari al 29%). La maggior parte delle mutazioni riscontrate ( $n = 28$ ) erano localizzate all'interno del dominio catalitico (78%), mentre 6 mutazioni erano distribuite lungo il dominio regolatorio (17%) e solo due mutazioni (5.5%) appartenevano al dominio coinvolto nel processo di tetramerizzazione. Nell'ambito delle tre classi fenotipiche, la mutazione c.1066-11G>A (IVS10nt-11G>A) è risultata la più frequente nel gruppo dei pazienti con classica PKU (33%), la p.R261Q è risultata essere prevalente sia nel gruppo con classica PKU (28%) e sia nel gruppo delle mild-PKU (25%).

Dei nove pazienti che presentavano un genotipo omozigote, sette pazienti erano portatori delle mutazioni p.R252W, c.1055delG, c.1066-11G>A and c.592-613del22 (pazienti CE, CN, CMP, GF, PA, SA, SI) e presentavano un fenotipo classico di PKU, in accordo con l'assente o molto bassa attività enzimatica residua associata con queste mutazioni (Zurflüh MR et al., 2008). Mentre due pazienti omozigoti per la R261Q (pazienti MM e PA), sono stati associati a differenti classi fenotipiche (**Tabella 1**). Come suggerito da Guldberg *et al.*, in pazienti eterozigoti, le mutazioni più lievi della PAH potrebbero esercitare un ruolo dominante sull'outcome fenotipico; tuttavia, in alcuni casi la correlazione tra il genotipo e il fenotipo presenta alcune discordanze, in quanto il fenotipo metabolico non correla con gli effetti previsti sulla base del genotipo (Guldberg P et al., 1998). Per esempio, nella nostra casistica, la mutazione “mild” p.R261Q, in combinazione con mutazioni con effetto nullo, quali la p.P281L, la c.1066-11G>A e la c.842+3G>C sono associati a un fenotipo severo (pazienti EG, FG, FV, IR, MN e MR). Inoltre, la mutazione p.R158Q, alla quale corrisponde *in vitro* un'attività enzimatica residua del 10%, nel paziente DCA, in cui è associata alla mutazione “nonsense” p.R176X, è associata a un fenotipo classico. Infine, inaspettatamente,

nel paziente CB, portatore del genotipo p.[L48S] + [R261Q], in cui entrambe le mutazioni sono associate ad un'attività enzimatica residua > 25%, è stato osservato un fenotipo severo. Dai risultati dell'analisi molecolare del gene PAH, si evince che 34 pazienti (54%) presentavano almeno una mutazione potenzialmente responsiva alla BH<sub>4</sub>; in particolare, un allele potenzialmente responsivo alla BH<sub>4</sub> era presente in 13 pazienti affetti da PKU classica, in 13 pazienti con mild-PKU e in 7 pazienti con lieve HPA. Non erano presenti invece mutazioni associate alla responsività alla BH<sub>4</sub> (**Figura 6**). Tra le mutazioni identificate nella nostra popolazione di pazienti con iperfenilalaninemia, 3 mutazioni (ovvero la Q301P, la IVS06nt-2delA e la T418I) erano nuove mutazioni (Daniele A et al., 2009). La mutazione Q301P è stata localizzata nel dominio catalitico (**Figura 7**). L'espressione *in vitro* dell'enzima mutato è risultata ridotta. La Q301P, determina la sostituzione di un residuo di glutammina (Gln) con una prolina all'interno dell'elica Cα8. L'elica Cα8, contribuisce alla stabilizzazione della struttura terziaria del monomero della PAH. La sostituzione di un residuo idrofilico, quale è la Gln, con la prolina, che è molto più rigida, al centro dell'elica Cα8, potrebbe alterare significativamente la struttura dell'elica stessa e quindi compromettere la sua funzione di stabilizzazione. Un'altra nuova mutazione riscontrata nella nostra casistica è la IVS06nt--2delA (c707-2delA), che è una mutazione di splicing. È molto interessante notare che questa nuova mutazione nel nostro paziente era associata ad una mutazione severa (p.P281L), tuttavia la paziente presentava un fenotipo molto lieve (paziente VR), indicando in tal modo che la mutazione c707-2delA potrebbe produrre un'attività enzimatica residua, sebbene non sia da escludere la possibilità di un meccanismo di complementarietà inter-allelica. Sia per la mutazione c707-2delA che per l'altra neo-mutazione descritta nella nostra casistica, ovvero la T418I, non sono stati effettuati studi funzionali delle varianti proteiche.



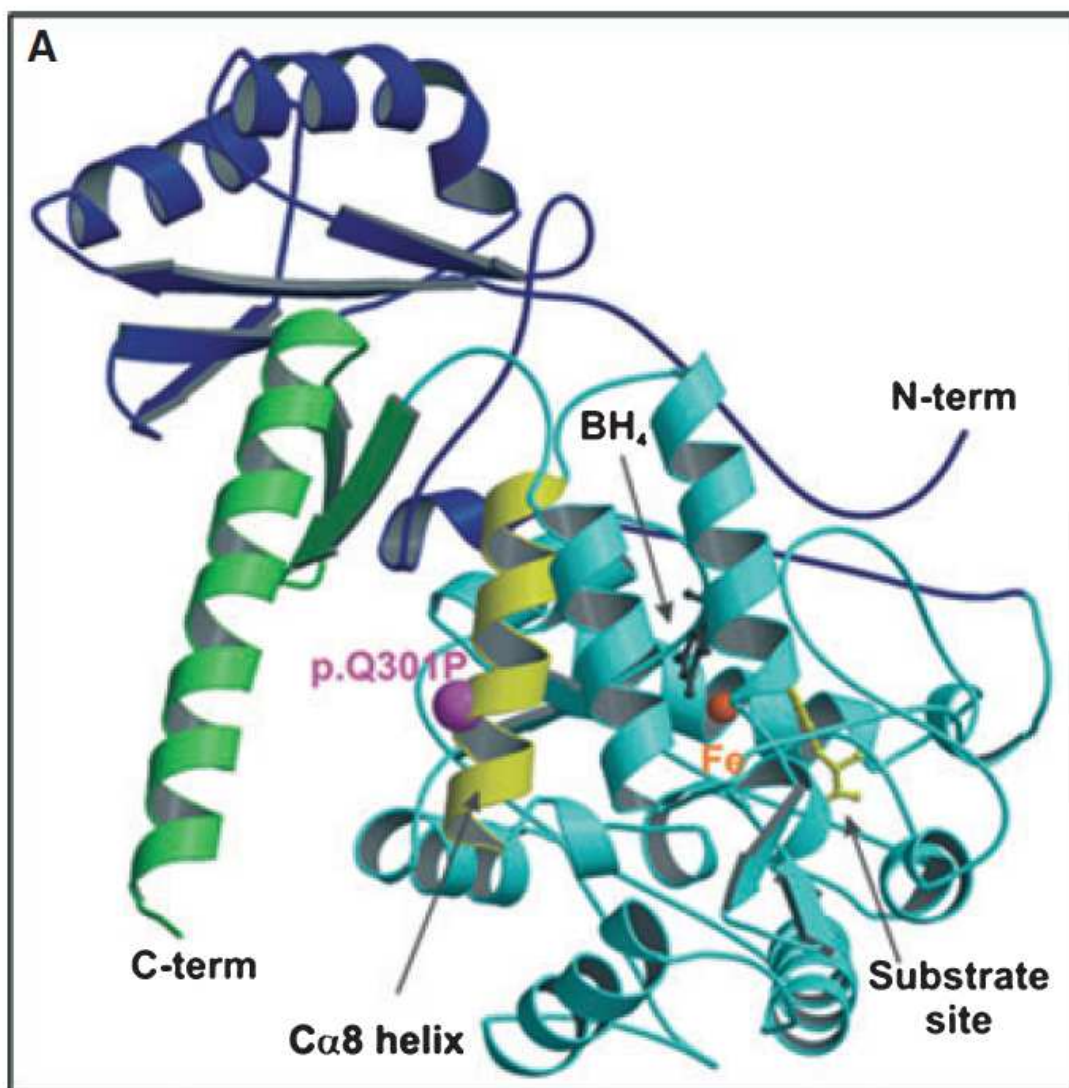
**Figura 6**

### Mappe delle mutazioni della PAH.

Mutazioni riscontrate in pazienti con HPA risultati responsivi alla BH<sub>4</sub>.

Nota: le frecce indicano le mutazioni potenzialmente responsive alla BH<sub>4</sub> presenti nella nostra casistica.

Source: BIOPKU database (www.bh4.org).



**Figura 7**

**Schematica rappresentazione del monomero di PAH.**

*Il dominio catalitico, il dominio regolatorio e il dominio di tetramerizzazione sono rappresentati rispettivamente in azzurro, in blu e in verde. L'elica Cα8 è mostrata in giallo. La localizzazione della mutazione **Q301P** è rappresentata da una sfera color magenta. Il cofattore BH<sub>4</sub>, è evidenziato in grigio e lo ione Fe come una sfera di colore arancio.*

### 3.11.3 Risultati dei test da carico con BH<sub>4</sub> per la valutazione della BH<sub>4</sub>-responsività

Dei 63 pazienti arruolati, solo 28 sono stati sottoposti al test da carico con BH<sub>4</sub>.

Dei 28 pazienti sottoposti finora al test da carico, solo 14 pazienti (3 cPKU, 8 mPKU, 3 MHP) sono risultati sensibili alla BH<sub>4</sub>, hanno cioè presentato una riduzione della fenilalanina plasmatica almeno del 30% rispetto al T<sub>0</sub> durante le 48 ore del test da carico con BH<sub>4</sub> (**Figura 8**).

Le principali caratteristiche cliniche dei pazienti che sono risultati sensibili alla somministrazione esogena della BH<sub>4</sub> durante il test da carico con BH<sub>4</sub>, sono riassunte nella **tabella 2**. Dei 14 pazienti risultati responsivi alla BH<sub>4</sub>, 12 pazienti (86%) erano eterozigoti composti per mutazioni note con almeno un allele potenzialmente responsivo (R261Q, L48S, R158Q, D338Y e la D222G). Dei pazienti risultati responsivi al test da carico con BH<sub>4</sub>, otto pazienti (57%) presentavano valori plasmatici di Phe a T<sub>0</sub> < 600 µmol/L, mentre 6 pazienti avevano una concentrazione plasmatica basale di Phe compresa tra 600 e 1200 µmol/L. Nessun paziente risultato *responder* presentava valori plasmatici di Phe a T<sub>0</sub> >1200 (**Tabella 3**). Dei quattordici pazienti risultati responsivi alla BH<sub>4</sub>, due pazienti (14%) sono risultati “*rapid responders*”, tre pazienti (21%) sono risultati “*moderate responders*” e 6 pazienti (43%) sono stati considerati “*slow responders*”. In 3 pazienti la risposta alla BH<sub>4</sub> non è risultata compatibile con nessuna delle classi descritte da Fiege et al. (2005). (**Tabella 4**). Dei 14 pazienti risultati “*responders*” al test da carico con BH<sub>4</sub>, tre pazienti con fenotipo classico e tre pazienti con HPA di tipo II (BA, DM, MG) sono risultati “*slow responders*”. Nessuno dei pazienti con HPA III, ha presentato una *slow response*. Inoltre dei tre pazienti con fenotipo lieve, risultati “*responders*” al test da carico con BH<sub>4</sub>, 1 paziente è risultato *rapid responder* (PA), 1 paziente (GN) è risultato *moderate responder* e 1 paziente (DV) ha presentato una risposta che non era inquadrabile in nessuna delle classi descritte da Fiege et al. (2005) (**Tabella 4**).

La paziente B.C., risultata sensibile al test da carico con BH<sub>4</sub>, presentava un fenotipo lieve e nel genotipo due mutazioni non severe (R158Q con attività enzimatica residua stimata del 10%; R261Q con attività enzimatica residua stimata del 27% ). Ha seguito per due settimane e durante il ricovero una dieta con 1180 mg di Phe/die equamente divisi ai tre pasti principali nell’arco della giornata. Come è possibile notare nella **tabella 5** e nella **figura 9**,

la paziente pur non rientrando pienamente nei criteri di Fiege e collaboratori, è stata considerata BH<sub>4</sub>-responsiva (*slow-responder*).

La paziente F.V., presentava un fenotipo classico e una mutazione potenzialmente responsiva (R261Q); la paziente presentava accoppiata alla R261Q la mutazione P281L localizzata nella regione di legame al cofattore (CBR2) mai descritta come responsiva alla BH<sub>4</sub>.

Ha assunto per due settimane 801 mg di Phe al giorno, divisi equamente nei tre pasti principali, mantenendo livelli piuttosto stabili di fenilalaninemia (nei due prelievi praticati durante la settimana antecedente il test i livelli plasmatici di Phe sono stati pari a 17,7 mg/dl e 16,6 mg/dl). Durante il carico con BH<sub>4</sub> si è verificata una riduzione della fenilalaninemia inferiore al 20% (rispetto al valore basale) al T<sub>8</sub>, superiore al 20% al T<sub>24</sub> e superiore al 30% al T<sub>48</sub>. Secondo la classificazione di Fiege, F.V. è stata considerata *slow-responder*. I risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> sono mostrati nella **tabella 6** e nella **figura 10**.

La paziente C.B., pur avendo due mutazioni potenzialmente responsive (R261Q con attività enzimatica residua stimata del 27% e L48S con attività enzimatica residua stimata del 39%) presentava un fenotipo classico. Durante il carico con BH<sub>4</sub> la fenilalaninemia si è ridotta del 66,6% rispetto al valore base, pertanto è risultata responsiva alla BH<sub>4</sub> (*slow-responder*). I risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> sono mostrati nella **tabella 7** e nella **figura 11**.

Il paziente D.V., pur avendo un genotipo lieve (L48S; R158Q), con due mutazioni potenzialmente responsive, presentava una fenilalaninemia >20 mg/dl alla nascita per motivi non chiari. Ha seguito per due settimane una dieta con intake controllato di Phe (1954 mg/die) mantenendo livelli plasmatici di Phe costanti come mostrato dai due prelievi praticati durante la settimana antecedente il test. La percentuale di riduzione massima durante il test da carico con BH<sub>4</sub> è stata del 46%. Il paziente è risultato pertanto BH<sub>4</sub>-responsivo, pur non rientrando in nessuna delle classi individuate da Fiege. I risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> sono mostrati nella **tabella 8** e nella **figura 12**.

Il paziente D.N., fratello minore di D.V., e pur avendo lo stesso genotipo [L48S + R158Q], a differenza del fratello, è stato classificato come una mild PKU, con una tolleranza pari a 380-690 mg di Phe/die. Ha seguito per due settimane una dieta con intake controllato di Phe (1954 mg/die) mantenendo livelli plasmatici di Phe costanti. Il pattern di riduzione della fenilalaninemia durante il test da carico è risultato molto simile a quello del fratello raggiungendo una riduzione percentuale dei livelli plasmatici di Phe del 48%. Analogamente

al fratello, D.V è risultato sensibile alla BH<sub>4</sub>, pur non rientrando in nessuna delle classi individuate da Fiege. I risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> sono mostrati **tabella 9 e nella figura 13.**

Il paziente MG, portatore della nuova mutazione (Q301P), ha seguito per due settimane una dieta con intake controllato di Phe (711 mg/die) mantenendo livelli plasmatici di Phe costanti come mostrato dai due prelievi praticati durante la settimana antecedente il test. Inaspettatamente, in questo paziente abbiamo osservato una percentuale di riduzione massima durante il test da carico con BH<sub>4</sub> del 77%, che è la percentuale di riduzione più alta tra tutti i nostri pazienti sottoposti al test da carico con BH<sub>4</sub>. Il paziente è risultato pertanto BH<sub>4</sub>-responsivo (*slow-responder*). I risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> sono mostrati nella **tabella 10 e nella figura 14.**

Nella **tabella 11** sono riportate le caratteristiche dei pazienti risultati “*non responsivi*” alla BH<sub>4</sub>.

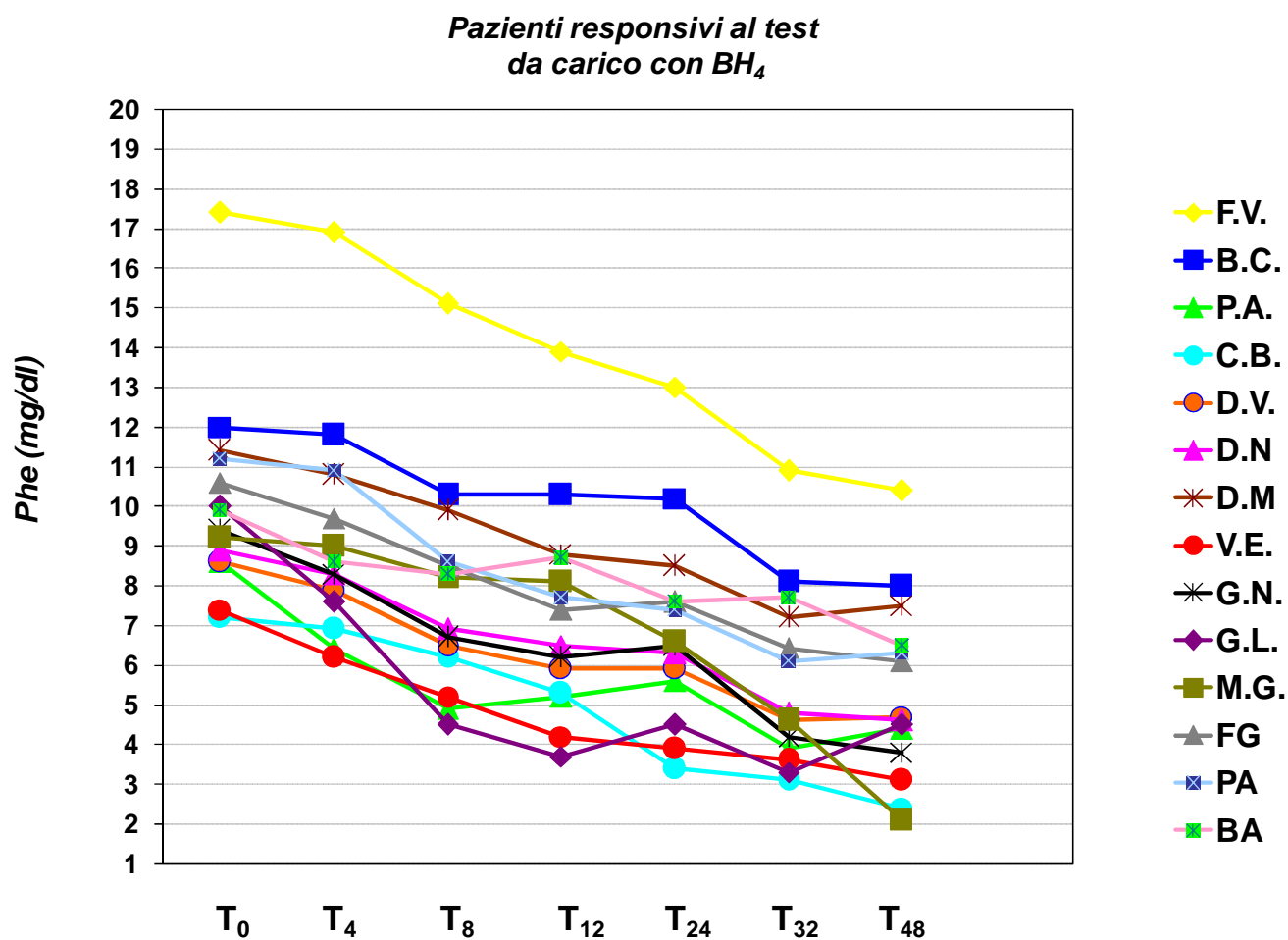
Tra i pazienti risultati “*non responsivi*” vi è il paziente V.C., affetto da MHP, con una tolleranza di 1100 mg di Phe/die. In questo paziente, l’analisi molecolare del gene PAH ha evidenziato due mutazioni potenzialmente responsive (L48S; R261Q). Il ragazzo ha seguito una dieta contenente 2094 mg di Phe divisa equamente nei tre pasti per due settimane, mantenendo una concentrazione plasmatica di Phe abbastanza costante (i due prelievi praticati nella settimana antecedente il test mostravano una fenilalaninemia di 7,3 mg/dl e 6,8 mg/dl rispettivamente). Durante il test da carico con BH<sub>4</sub> abbiamo osservato un’iniziale riduzione della Phe plasmatica seguita però da un suo aumento repentino relativo molto probabilmente al rialzo della temperatura corporea riscontrata nel ragazzo per un’infezione intercorrente.

I risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> sono mostrati nella **tabella 12 e nella figura 15.** Pertanto, nonostante il paziente sia risultato “*non responder*” alla BH<sub>4</sub>, dato l’episodio infettivo intercorrente, per verificare la reale sensibilità di questo paziente alla BH<sub>4</sub>, potrebbe, ripetere il test da carico con la BH<sub>4</sub>, per escludere un falso-negativo, data la probabile interferenza dell’iperpiressia, che è noto provocare un aumento del catabolismo proteico.

Infine, tra i pazienti “*non-responders*”, abbiamo la paziente VR, portatrice del genotipo [P281L] + [c.707-2delA], di cui la c.707-2delA è la seconda nuova mutazione descritta in questo lavoro.



La paziente ha seguito una dieta contenente 1243 mg di Phe divisa equamente nei tre pasti per due settimane, mantenendo una concentrazione plasmatica di Phe abbastanza costante. Durante il test da carico con  $\text{BH}_4$  abbiamo osservato un'iniziale riduzione della Phe plasmatica seguita però da un suo aumento repentino, pertanto la paziente è risultata “*non-responder*”. I risultati del test da carico con  $\text{BH}_4$  sono mostrati nella **tabella 13** e nella **figura 16**.



**Figura 8**

Profilo della concentrazione plasmatica della fenilalanina dopo la somministrazione orale a T<sub>0</sub> e a T<sub>24</sub> di  $BH_4$  al dosaggio di 20 mg/Kg in 14 pazienti con HPA risultati “responder” al test da carico con  $BH_4$

Tabella 2 - Caratteristiche dei pazienti risultati “**responsivi**” al test da carico con BH<sub>4</sub>

<i>Paziente</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Fenotipo biochimico</i>	<i>Tolleranza Storica (mg/die Phe)</i>	<i>Dieta pre-test mg/die (Phe corrispondente mg/dl)</i>	<i>% riduzione al Test da carico con BH<sub>4</sub></i>
<b>C. B.</b>	<b>R261Q* L48S*</b>	<b>cPKU</b>	<b>300</b>	<b>1335</b> (7.2 mg/dl)	<b>66.6 (T<sub>24</sub>)</b>
<b>F. G.</b>	<b>R261Q* P281L</b>	<b>cPKU</b>	<b>325</b>	<b>513</b> (11.9mg/dl)	<b>43 (T<sub>32</sub>)</b>
<b>F. V.</b>	<b>R261Q* P281L</b>	<b>cPKU</b>	<b>280</b>	<b>801</b> (17 mg/dl)	<b>40 (T<sub>32</sub>)</b>
<b>B. A.</b>	<i>R261Q* IVS10nt-11G&gt;A</i>	<b>mPKU</b>	<b>440</b>	<b>915</b> (10 mg/dl)	<b>34 (T<sub>72</sub>)</b>
<b>B. C.</b>	<b>R261Q* R158Q*</b>	<b>mPKU</b>	<b>400</b>	<b>786 /1180</b> ( 12.7 mg/dl)	<b>33.3 (T<sub>32</sub>)</b>
<b>D. M.</b>	<b>R261Q* P281L</b>	<b>mPKU</b>	<b>395</b>	<b>1228</b> (8.5 mg/dl)	<b>36.8 (T<sub>32</sub>)</b>
<b>D. N.</b>	<b>L48S* R158Q*</b>	<b>mPKU</b>	<b>505</b>	<b>1321 /1954</b> (8.4 mg/dl)	<b>48 (T<sub>32</sub>)</b>
<b>G. L.</b>	<b>165delT P366H</b>	<b>mPKU</b>	<b>500</b>	<b>3187</b> (10 mg/dl)	<b>67 (T<sub>8</sub>)</b>
<b>M. G.</b>	<b>L48S* Q301P</b>	<b>mPKU</b>	<b>385</b>	<b>711</b> (8,2 mg/dl)	<b>77.1 (T<sub>32</sub>)</b>
<b>P. A.</b>	<b>R261Q* R261Q*</b>	<b>mPKU</b>	<b>400</b>	<b>817 /1267</b> (6,5 mg/dl)	<b>44 (T<sub>12</sub>)</b>
<b>V. E.</b>	<b>L48S* D222G*</b>	<b>mPKU</b>	<b>450</b>	<b>1120 /1995</b> (7.3 mg/dl)	<b>58 (T<sub>12</sub>)</b>
<b>D. V.</b>	<b>L48S* R158Q*</b>	<b>MHP</b>	<b>650</b>	<b>1342 /1954</b> (7.35 mg/dl)	<b>45 (T<sub>12</sub>)</b>
<b>G. N.</b>	<b>165delT P366H</b>	<b>MHP</b>	<b>1920</b>	<b>3187</b> (10.3 mg/dl)	<b>59 (T<sub>12</sub>)</b>
<b>P. A.</b>	<b>R158Q* D338Y*</b>	<b>MHP</b>	<b>1500</b>	<b>2658</b> (8 mg/dl)	<b>54.6 (T<sub>8</sub>)</b>

\* Mutazione BH4-responsive

**Tabella 3 - Responsività alla BH<sub>4</sub> e valori basali di fenilalanina**

<b>Phe plasmatica a T<sub>0</sub></b>				
	<i>n</i>	<b>&lt; 600 μmol/L</b>	<b>600-1200 μmol/L</b>	<b>&gt;1200 μmol/L</b>
Responsivi (totale)	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>0</b>
Rapid Reponder	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Moderate Reponder	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Slow Reponder	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
Non definiti	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

Tabella 4 – Tipo di risposta al test da carico con BH<sub>4</sub>

	<i>n</i>	<b>cPKU</b>	<b>mPKU</b>	<b>MHP</b>
Responsivi (totale)	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>3</b>
Rapid Responder	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Moderate Responder	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
Slow Responder	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
Non definiti	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

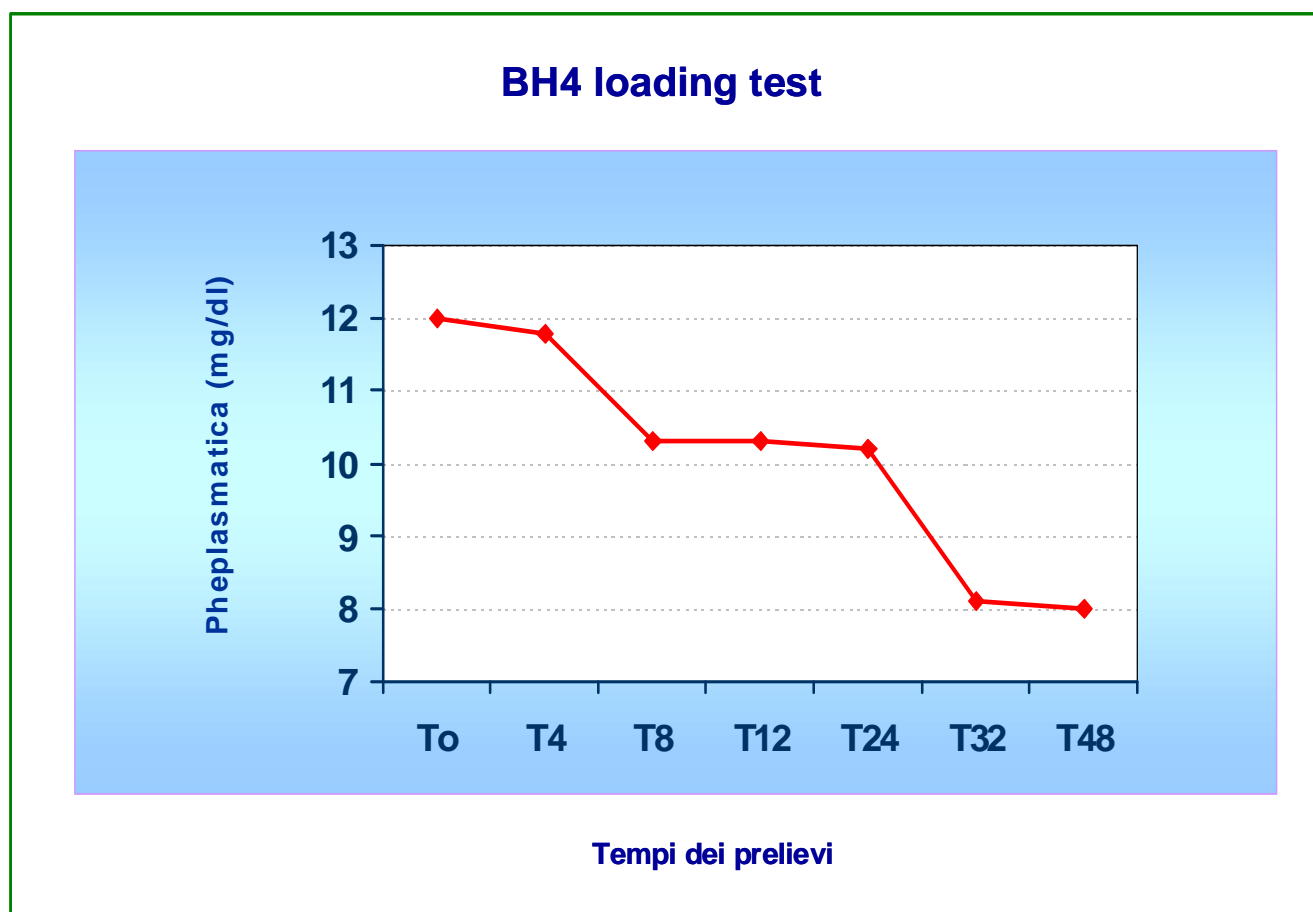
## Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> di B.C.

**Genotipo:** R158Q; R261Q

**Fenotipo:** mild PKU

	Phe mg/dl	Tyr $\mu$ mol/l	% Riduzione
$T_0$	12	54	
$T_4$	11,8	107	1,6
$T_8$	10,3	104	14,1
$T_{12}$	10,3	59	14,1
$T_{24}$	10,2	54	15
$T_{32}$	8,1	121	32,5
$T_{48}$	8	56	33,3

**Tabella 5** - Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente BC



**Figura 9** – Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente BC

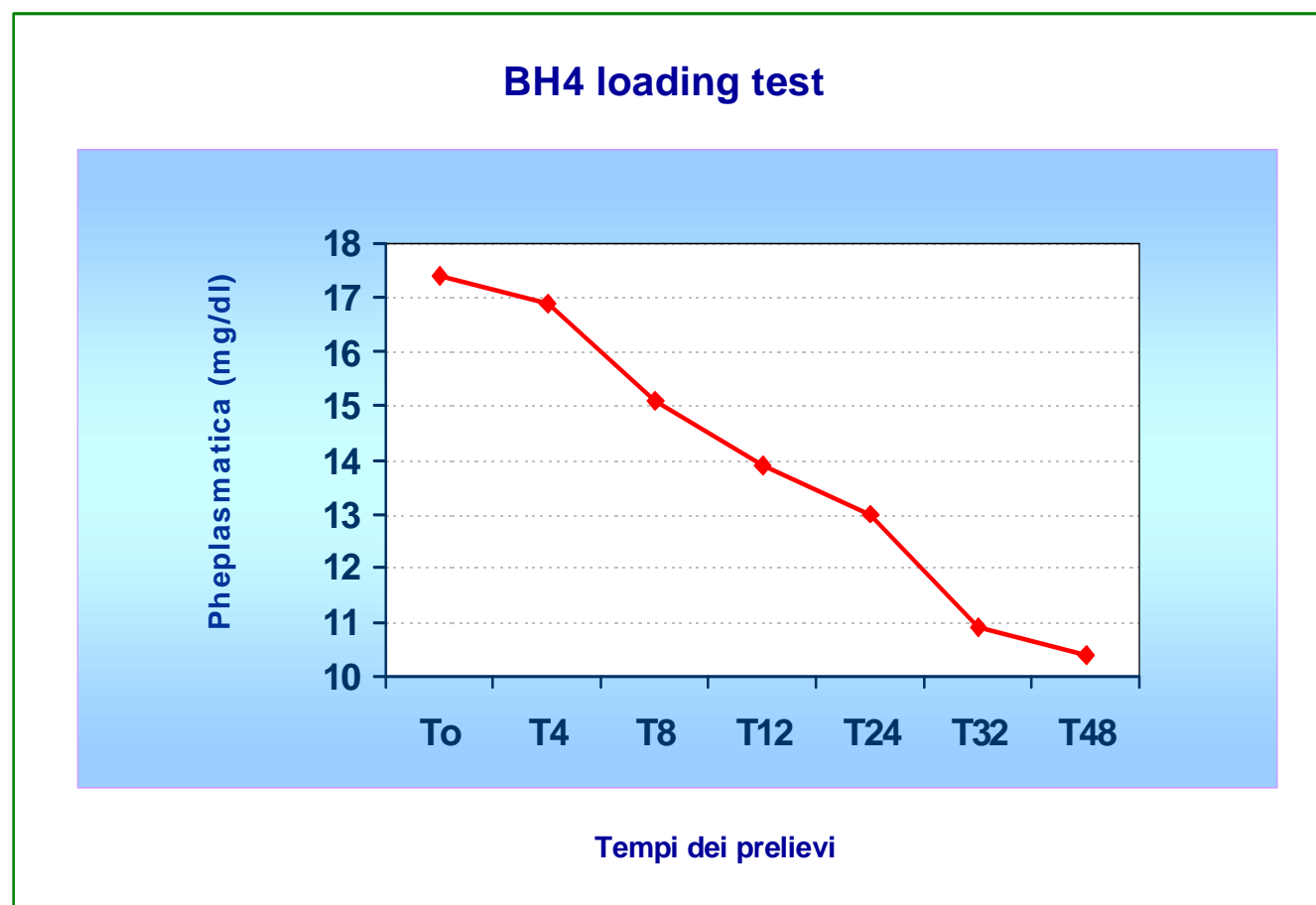
## Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> di F.V.

**Genotipo:** R261Q; P281L

**Fenotipo:** classic PKU

	Phe mg/dl	Tyr $\mu$ mol/l	% Riduzione
$T_0$	17,4	16	
$T_4$	16,9	55	2,8
$T_8$	15,1	54	13
$T_{12}$	13,9	56	20
$T_{24}$	13	54	25
$T_{32}$	10,9	58	37
$T_{48}$	10,4	47	40

**Tabella 6** - Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente FV



**Figura 10** – Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente FV

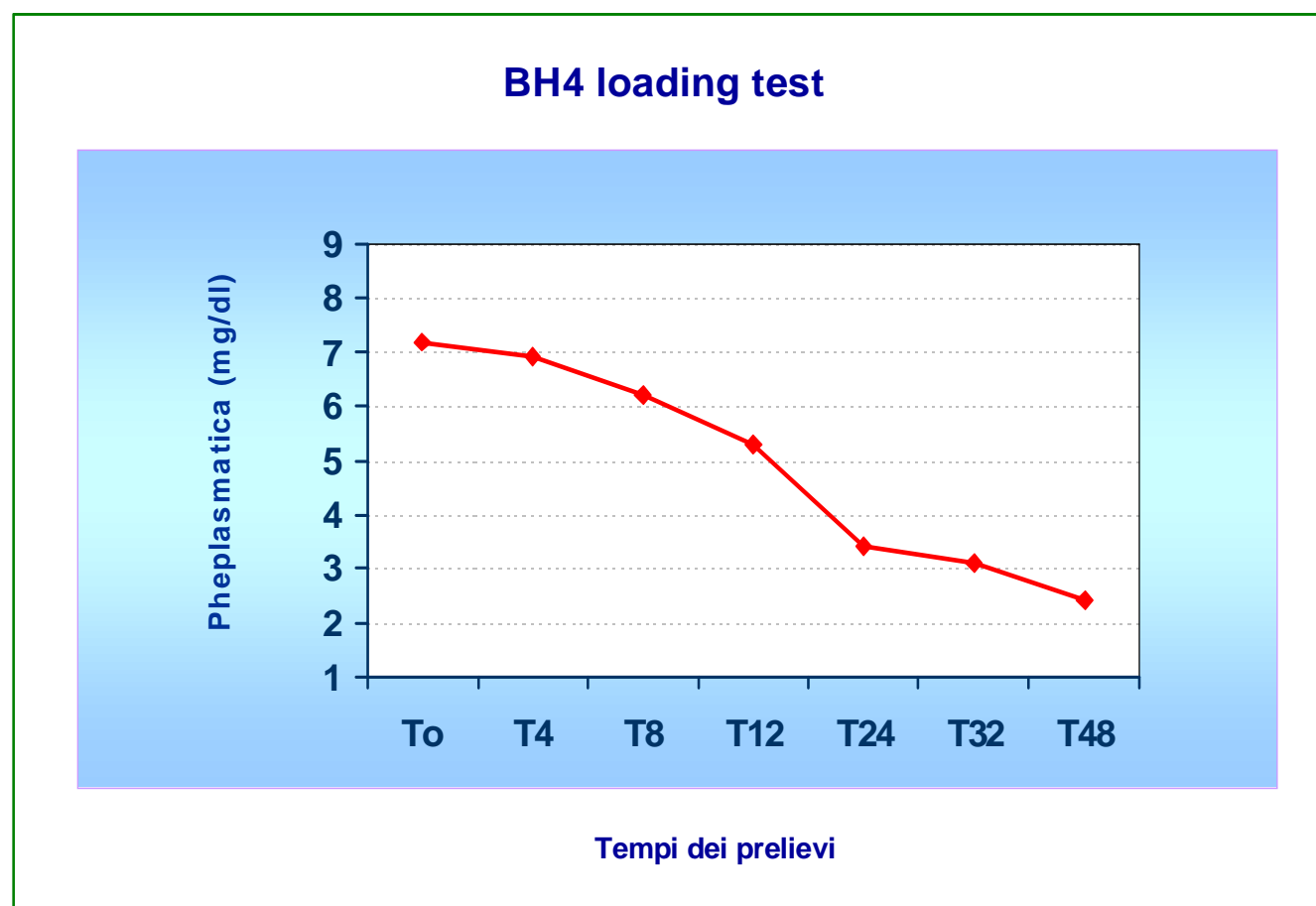
## Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> di C.B.

**Genotipo:** R261Q; L48S

**Fenotipo:** classic PKU

	Phe mg/dl	Tyr $\mu$ mol/l	% Riduzione
$T_0$	7,2	44	
$T_4$	6,9	54	4
$T_8$	6,2	65	13,8
$T_{12}$	5,3	58	26,3
$T_{24}$	3,4	55	52,7
$T_{32}$	3,1	63	56,9
$T_{48}$	2,4	42	66,6

**Tabella 7** - Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente CB



**Figura 11** – Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente CB



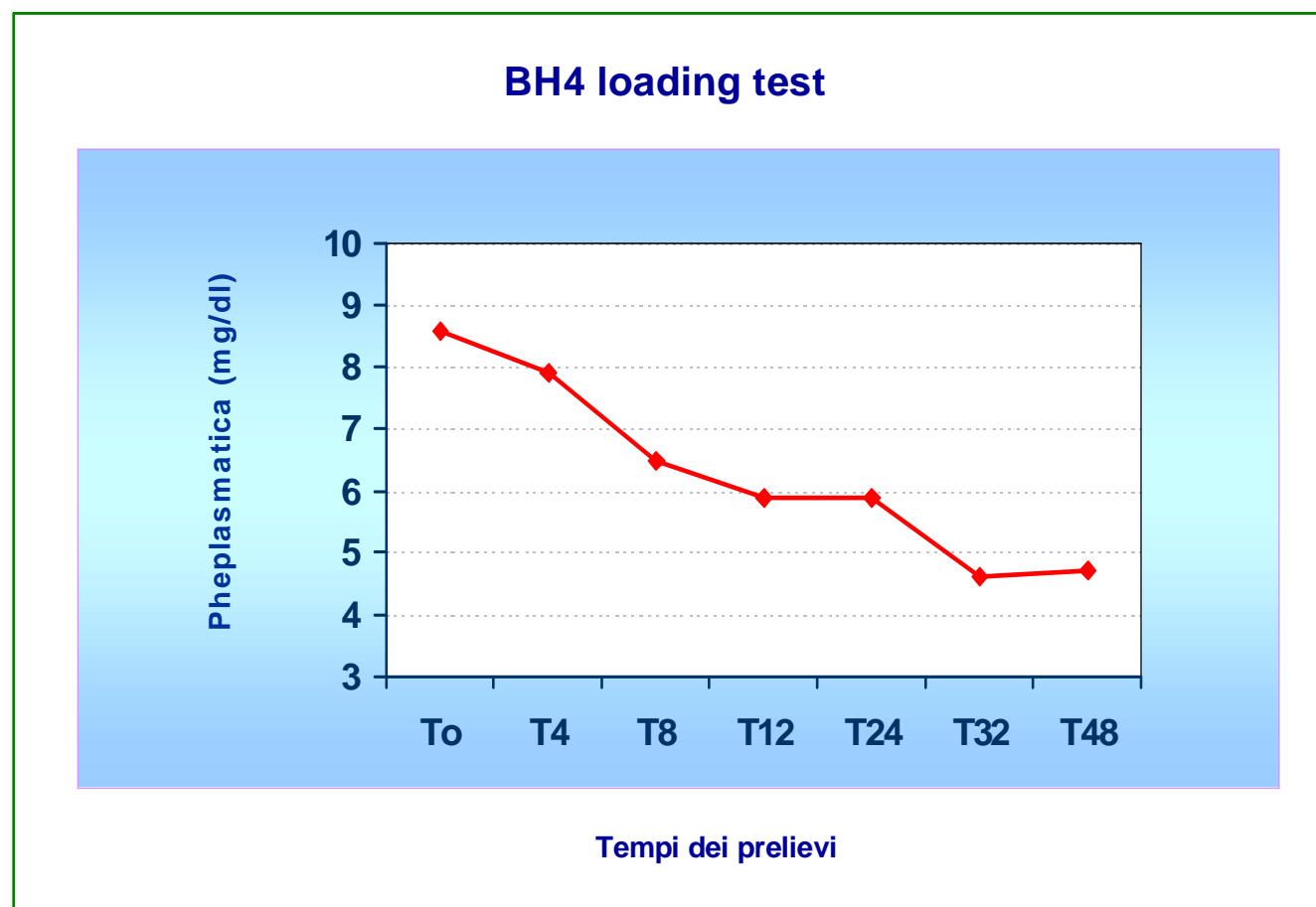
### Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> di D.V.

**Genotipo:** L48S; R158Q

**Fenotipo:** MHP

	Phe mg/dl	Tyr $\mu$ mol/l	% Riduzione
$T_0$	8,6	54	
$T_4$	7,9	88	8
$T_8$	6,5	63	24
$T_{12}$	5,9	58	31
$T_{24}$	5,9	51	31
$T_{32}$	4,6	54	46
$T_{48}$	4,7	52	45

**Tabella 8** - Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente DV



**Figura 12** – Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente DV

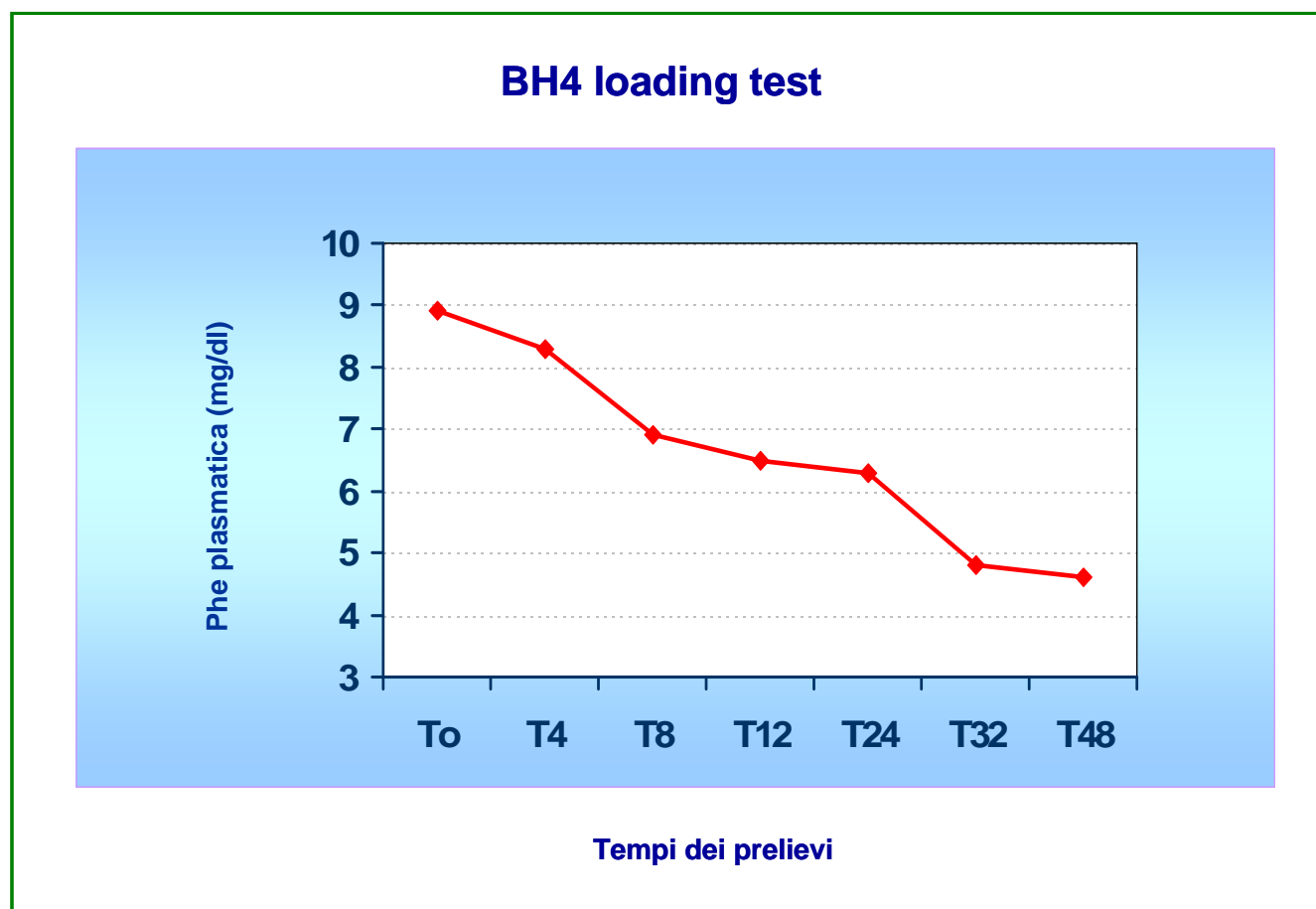
### Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> di D.N.

**Genotipo:** L48S; R158Q

**Fenotipo:** mild PKU

	Phe mg/dl	Tyr $\mu$ mol/l	% Riduzione
$T_0$	8,9	59	
$T_4$	8,3	78	6
$T_8$	6,9	55	22
$T_{12}$	6,5	50	26
$T_{24}$	6,3	56	29
$T_{32}$	4,8	67	46
$T_{48}$	4,6	56	48

**Tabella 9** - Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente DN



**Figura 13** – Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente DN

## Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> di M.G.

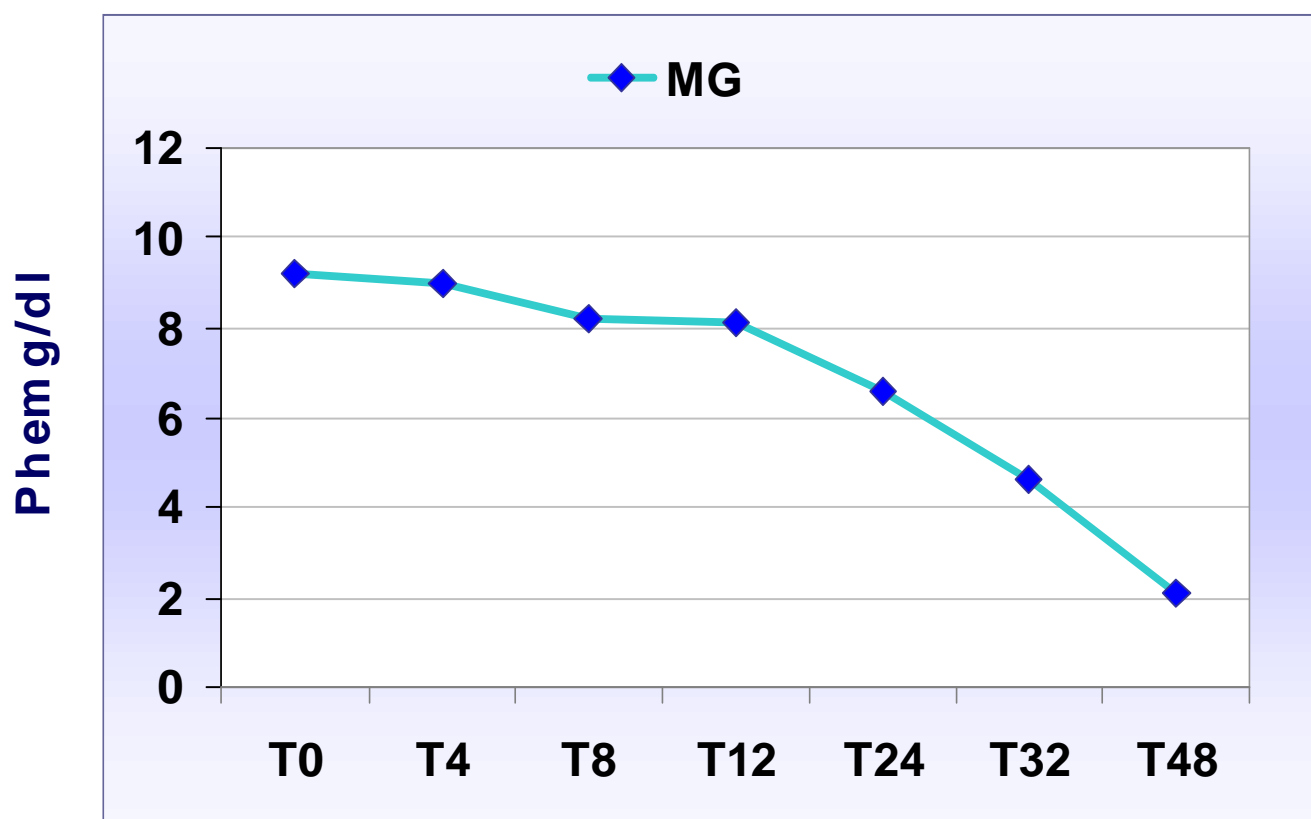
**Genotipo:** L48S; Q301P\*

**Fenotipo:** mild PKU

\* nuova mutazione

	Phe mg/dl	Tyr $\mu$ mol/l	% Riduzione
$T_0$	9,2	44	
$T_4$	9,0	69	2,1
$T_8$	8,2	41	10,8
$T_{12}$	8,1	43	11,9
$T_{24}$	6,6	42	28,2
$T_{32}$	4,6	136	50
$T_{48}$	2,1	59	77

**Tabella 10** - Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente MG



**Figura 14** – Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente MG

Tabella 11- Caratteristiche dei pazienti risultati “non responsivi” al test da carico con BH<sub>4</sub>

<i>Paziente</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Fenotipo biochimico</i>	<i>Tolleranza Storica (mg/die Phe)</i>	<i>Dieta pre-test mg/die (Phe corrispondente mg/dl)</i>
<b>C. P.</b>	<b>R261X IVS10nt11G&gt;A</b>	<b>cPKU</b>	<b>320</b>	<b>925</b> (10.5 mg/dl)
<b>D. R. R.</b>	<b>R252W R408W</b>	<b>cPKU</b>	<b>280</b>	<b>524</b> (12.6 mg/dl)
<b>E. G.</b>	<b>R261Q* IVS10nt-11G&gt;A</b>	<b>cPKU</b>	<b>350</b>	<b>837/1300</b> (5,6 mg/dl)
<b>I. R.</b>	<b>R261Q* IVS07nt3G&gt;C</b>	<b>cPKU</b>	<b>350</b>	<b>825</b> (12 mg/dl)
<b>M. C.</b>	<b>R261Q* IVS10nt-11G&gt;A</b>	<b>cPKU</b>	<b>340</b>	<b>760 /960</b> (4,2 mg/dl)
<b>M. F.</b>	<b>P281L Non nota</b>	<b>cPKU</b>	<b>350</b>	<b>1164</b> (10 mg/dl)
<b>M. R.</b>	<b>R261Q* IVS10nt-11G&gt;A</b>	<b>cPKU</b>	<b>265</b>	<b>764</b> (10.4 mg/dl)
<b>P. M. C.</b>	<b>L213P IVS10nt-11G&gt;A</b>	<b>cPKU</b>	<b>330</b>	<b>719</b> (12 mg/dl)
<b>R. R.</b>	<b>R261X IVS10nt11G&gt;A</b>	<b>cPKU</b>	<b>350</b>	<b>867</b> (17 mg/dl)
<b>S. I.</b>	<b>IVS10nt-11G&gt;A IVS10nt-11G&gt;A</b>	<b>cPKU</b>	<b>230</b>	<b>522</b> (8.5)
<b>E. S.</b>	<b>W187X P281L</b>	<b>mPKU</b>	<b>505</b>	<b>1137</b> (16 mg/dl)
<b>P. F.</b>	<b>IVS10nt-11G&gt;A 116-118delTCT</b>	<b>mPKU</b>	<b>390</b>	<b>742/962</b> (12.9 mg/dl)
<b>V. C.</b>	<b>R261Q* L48S*</b>	<b>MHP</b>	<b>1100</b>	<b>2094</b> (7.3 mg/dl)
<b>V. R.</b>	<b>IVS06nt-2delA P281L</b>	<b>MHP</b>	<b>630</b>	<b>1243</b> (14 mg/dl)

\* Mutazione BH<sub>4</sub>-responsive

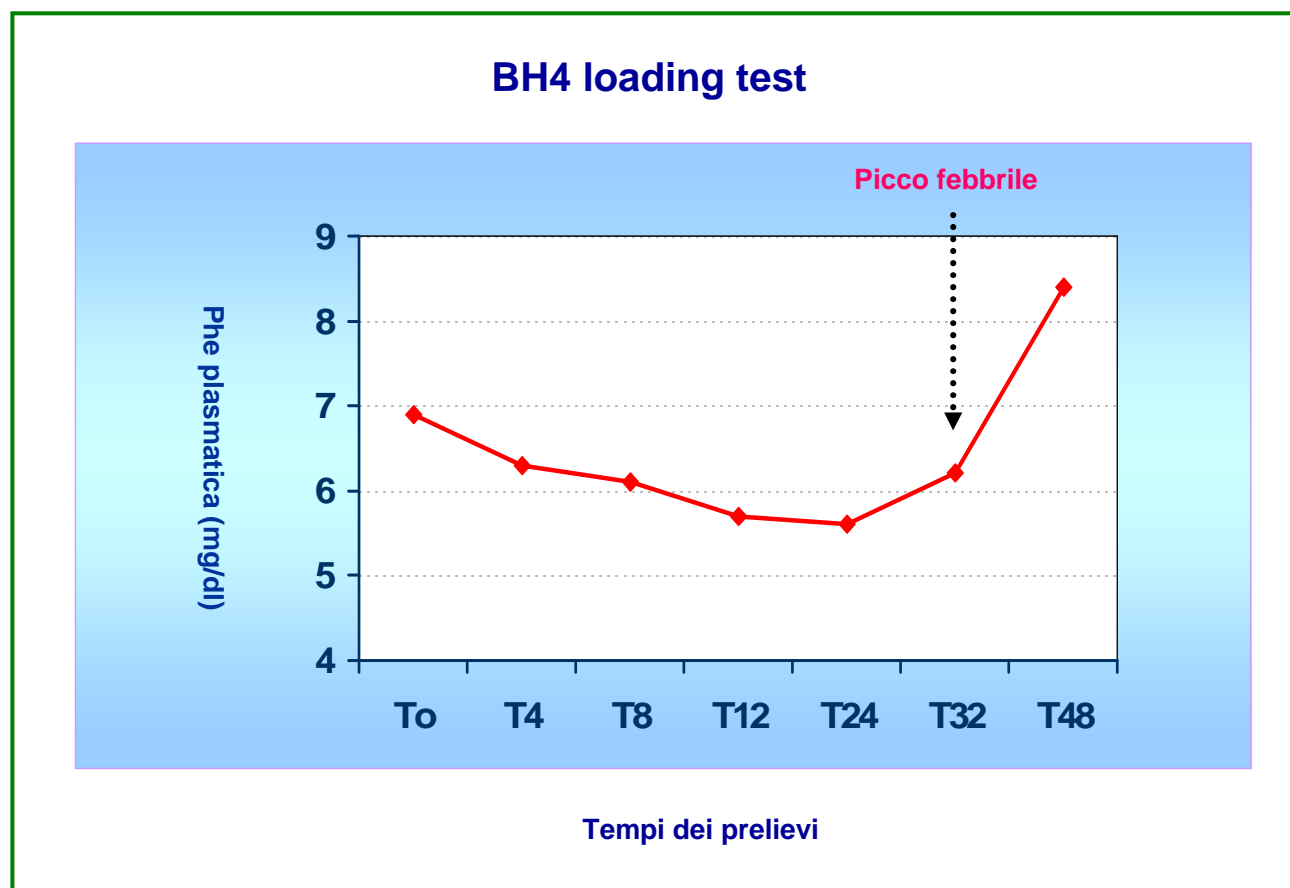
## Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> di V.C.

**Genotipo:** L48S; R261Q

**Fenotipo:** MHP

	Phe mg/dl	Tyr $\mu$ mol/l	% Riduzione
$T_0$	6,9	48	
$T_4$	6,3	65	8,6
$T_8$	6,1	63	11,5
$T_{12}$	5,7	55	17,3
$T_{24}$	5,6	41	18,8
$T_{32}$	6,2	40	10
$T_{48}$	8,4	39	+21,7

**Tabella 12** - Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente VC



**Figura 15** – Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente VC

### Risultati del test da carico con BH4 di V.R.

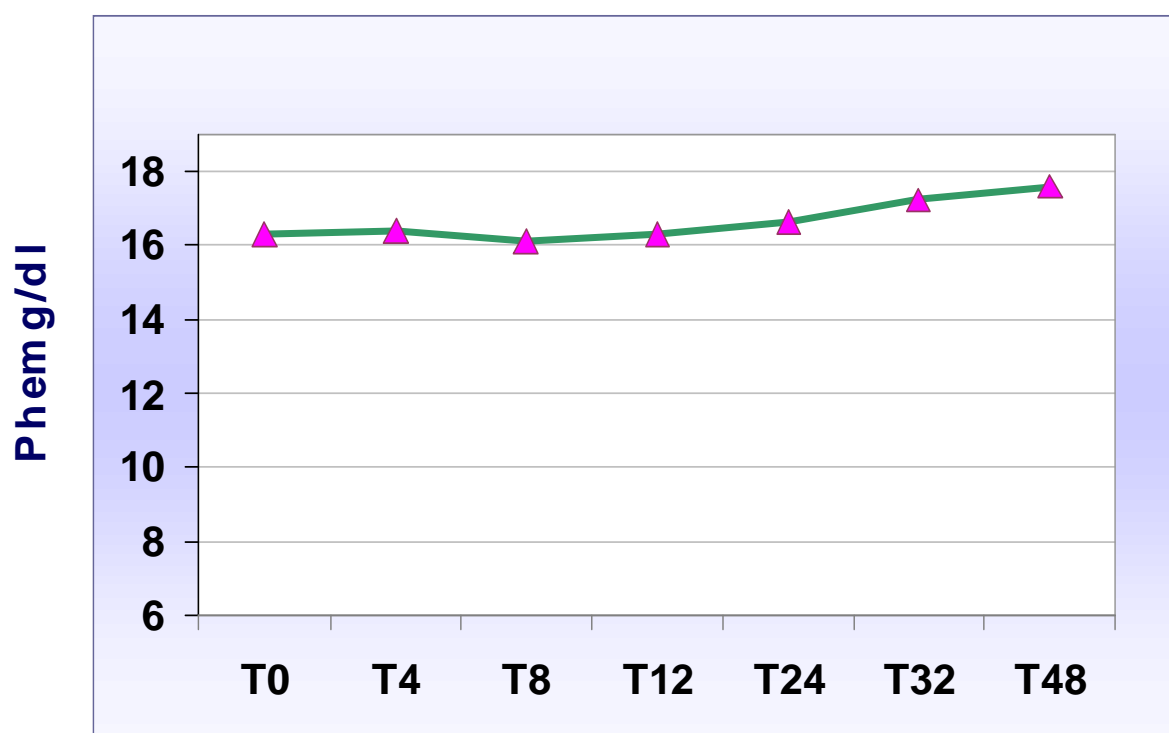
**Genotipo:** P281L; IVS06nt-2delA\*

**Fenotipo:** MHP

\* nuova mutazione

	Phe mg/dl	Tyr $\mu$ mol/l
$T_0$	16.3	51
$T_4$	16.4	98
$T_8$	16.1	142
$T_{12}$	16.3	64
$T_{24}$	16.6	45
$T_{32}$	17.2	164
$T_{48}$	17.6	38

**Tabella 13** - Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente VR



**Figura 16** – Risultati del test da carico con BH<sub>4</sub> nella paziente VR

#### **3.11.4 Risultati della terapia a lungo termine con BH<sub>4</sub>**

Dei 14 pazienti risultati responsivi al test da carico con BH<sub>4</sub>, solo 12 pazienti (2 cPKU, 7 mPKU e 3 MHP) hanno iniziato il trattamento a lungo termine con BH<sub>4</sub> al dosaggio di 10 mg/Kg/die, suddiviso in 3 somministrazioni. In due pazienti (DV e BC), il dosaggio è stato aumentato a 15 mg/Kg/die (**Tabella 14**).

Ogni settimana, è stato effettuato il dosaggio della Phe plasmatica, e se il valore ottenuto era nei limiti, veniva effettuato un incremento dell'intake di Phe pari a 200 mg di Phe/die.

La durata media del follow-up è stata di 14 mesi (*range: 2-22 mesi*). In cinque pazienti si è ottenuta una liberalizzazione del regime dietetico (1 cPKU, 2 mPKU e 2 MHP). Negli altri sette pazienti, si è osservato un progressivo aumento della tolleranza alla Phe, variabile da 2 a 7 volte rispetto alla loro tolleranza storica (**Tabella 14**). Durante il periodo di trattamento a lungo termine con BH<sub>4</sub>, 2 pazienti hanno presentato epigastralgia. Un paziente ha presentato inizialmente dolore addominale acuto e successivamente ha sviluppato un'appendicite.

**Tabella 14 – Risultati della terapia a lungo termine con BH<sub>4</sub> in 12 pazienti con HPA**

<b>Paziente</b>	<b>Fenotipo biochimico</b>	<b>Tolleranza Storica (mg/die Phe)</b>	<b>Intake di Phe (mg/die) raggiunto con BH<sub>4</sub></b>	<b>Phe corrispondente (mg/dl)</b>	<b>Follow-up (mesi)</b>
<b>C. B.</b>	<b>cPKU</b>	<b>300</b>	<b>Dieta Libera</b>	<b>3-4</b>	<b>19</b>
<b>F. V.</b>	<b>cPKU</b>	<b>280</b>	<b>1180</b>	<b>8.8-10.2</b>	<b>18</b>
<b>B. A.</b>	<b>mPKU</b>	<b>440</b>	<b>1188</b>	<b>9.5-10.5</b>	<b>2</b>
<b>B. C.</b>	<b>mPKU</b>	<b>400</b>	<b>1910</b>	<b>9-10</b>	<b>22</b>
<b>D. M.</b>	<b>mPKU</b>	<b>395</b>	<b>3673</b>	<b>9-10</b>	<b>17</b>
<b>D. N.</b>	<b>mPKU</b>	<b>505</b>	<b>3600</b>	<b>9.5-11</b>	<b>19</b>
<b>G. L.</b>	<b>mPKU</b>	<b>500</b>	<b>Dieta Libera</b>	<b>7-10</b>	<b>21</b>
<b>M. G.</b>	<b>mPKU</b>	<b>385</b>	<b>1611</b>	<b>4.9-6.1</b>	<b>5</b>
<b>V. E.</b>	<b>mPKU</b>	<b>450</b>	<b>Dieta Libera</b>	<b>2.9-3.5</b>	<b>14</b>
<b>D. V.</b>	<b>MHP</b>	<b>650</b>	<b>3871</b>	<b>9.2-10.7</b>	<b>19</b>
<b>G. N.</b>	<b>MHP</b>	<b>1920</b>	<b>Dieta Libera</b>	<b>9.5-10.5</b>	<b>22</b>
<b>P. A.</b>	<b>MHP</b>	<b>1500</b>	<b>Dieta Libera</b>	<b>4.8-7.4</b>	<b>12</b>



### 3.12 DISCUSSIONE

La dieta a ridotto contenuto di fenilalanina per tutta la vita rappresenta ancora oggi la pietra miliare per il trattamento delle HPA, tuttavia “a diet for life” non è facile da seguire, in particolar modo per gli adolescenti e gli adulti. Sebbene già in passato era stato suggerito da Niederwieser e Curtis (Niederwieser A and Curtius HC, 1985) e successivamente da Ponzzone e collaboratori (Ponzzone A *et al.*, 1991) che alcuni pazienti con deficit della PAH potevano presentare una riduzione dei livelli plasmatici di fenilalanina durante il test da carico con la BH<sub>4</sub>, soltanto nel 1999 dopo il primo studio di Kure (Kure *et al.*, 1999), la somministrazione esogena di BH<sub>4</sub> è stata presa in considerazione come una possibile alternativa terapeutica alla dieta a ristretto contenuto di Phe. Successivamente, molti studi hanno provato l'efficacia della BH<sub>4</sub> e molte mutazioni del gene della PAH sono state riconosciute responsive al cofattore esogeno (**Figura 6**).

La base della responsività alla BH<sub>4</sub> potrebbe essere multifattoriale. Numerosi sono i meccanismi d'azione della BH<sub>4</sub> ipotizzati sulla base degli studi effettuati finora, ma ancora poco si sa circa il significato *in vivo* di queste scoperte. La risposta favorevole in seguito alla somministrazione della BH<sub>4</sub> potrebbe essere legata ad un miglioramento del legame del cofattore BH<sub>4</sub> all'enzima mutato, poiché l'enzima mutato necessiterebbe di maggiori quantità di BH<sub>4</sub>. Altri fattori potrebbero spiegare l'effetto favorevole della BH<sub>4</sub> sull'enzima mutato, quali: un aumento dell'emivita, prevenzione del cattivo ripiegamento (*misfolding*). L'aumento dell'emivita dell'enzima mutato potrebbe suggerire un effetto protettivo simil “*chaperone farmacologico*” della BH<sub>4</sub>. Tale meccanismo sembrerebbe essere il principale meccanismo molecolare alla base della responsività alla BH<sub>4</sub> (Muntau AC & Gersting SW, 2010). Nel presente studio, dei quattordici pazienti risultati “responders alla BH<sub>4</sub>”, nove pazienti (64%) presentavano mutazioni localizzate nella regione di legame con il cofattore (R261Q, P281L, IVS10nt-11G>A, D222G e la D338Y): diversi autori suggeriscono che queste mutazioni aumentino la costante di Michaelis-Menten (Km) dell'enzima PAH, la cui attività residua potrebbe essere stimolata con la supplementazione di BH<sub>4</sub>; la Km è una misura dell'affinità di legame di un enzima per il suo ligando (substrato o cofattore) ed è definita come la concentrazione di ligando richiesta per occupare la metà dei siti di legame per il ligando stesso (Blau N *et al.*, 2004). Molto probabilmente con la somministrazione del cofattore esogeno si determina un aumento delle concentrazioni intracellulari di ligando (BH<sub>4</sub>) che attiverebbe l'enzima mutato. È riportato in letteratura che la maggior parte delle

mutazioni descritte in letteratura come responsive alla BH<sub>4</sub> risiedono nel sito catalitico dell'enzima. Anche nel nostro studio, le mutazioni più frequentemente presenti nei pazienti risultati responsivi al test da carico con BH<sub>4</sub> erano localizzate nel sito catalitico (R261Q, R158Q). Tra queste la mutazione R261Q, localizzata nella regione CBR1, è stata, in diversi studi, inconsistentemente associata alla responsività alla BH<sub>4</sub>, probabilmente in relazione ai diversi protocolli utilizzati per praticare il test da carico; nella nostra casistica, tale mutazione è stata riscontrata in sette pazienti risultati sensibili alla BH<sub>4</sub> e in cinque pazienti risultati “*non responder*”.

L'unica mutazione, ritrovata in pazienti responsivi alla BH<sub>4</sub>, localizzata nel sito di regolazione dell'enzima è stata la mutazione L48S: la sostituzione dell'aminoacido leucina con serina polarizza l'area idrofobica presente tra il dominio di regolazione e il dominio catalitico del secondo monomero. La mutazione L48S è stata ritrovata in pazienti responsivi al test da carico con BH<sub>4</sub> se presente in omozigosi o in eterozigosi con un'altra mutazione lieve, ovvero con attività enzimatica residua in vitro. Anche nella nostra casistica, nei pazienti BH<sub>4</sub>-responsivi, la mutazione L48S è stata associata ad un'altra mutazione potenzialmente responsiva (R261Q, R158Q, D222G).

È stato, inoltre, ipotizzato che la responsività alla BH<sub>4</sub> è possibile solo se è presente su uno dei due alleli della PAH una mutazione che comporta un'attività enzimatica residua. A tal proposito, in diversi studi è stato osservato che pazienti con mild-PKU e con MHP, in cui è presente una più elevata attività enzimatica residua, sono nella maggior parte dei casi più *responsivi* alla BH<sub>4</sub> rispetto ai pazienti con fenotipo classico che hanno invece una bassa o assente attività della PAH (Blau N et al., 2008). Nella nostra casistica, anche se esigua, abbiamo ritrovato una responsività alla BH<sub>4</sub> in tutte le classi fenotipiche: dei 14 pazienti responsivi alla BH<sub>4</sub>, 3 pazienti presentavano una PKU classica, 8 pazienti una PKU lieve ed infine 3 pazienti una MHP. Pertanto, anche i nostri dati hanno mostrato che la responsività alla BH<sub>4</sub> non è limitata solo ai pazienti con mild PKU e alle MHP ma è possibile anche in pazienti con fenotipo severo. Nella nostra casistica, in particolare, in una paziente con fenotipo classico (paziente CB), il trattamento a lungo termine ha determinato un significativo aumento della tolleranza alla Phe al punto da consentire in questa paziente la liberalizzazione della dieta (**Tabella 14**), migliorandone fortemente la qualità di vita.

Riteniamo, quindi, che l'indicatore più importante della responsività alla BH<sub>4</sub> è la combinazione delle mutazioni, indipendentemente dal fenotipo clinico. È molto importante

quindi riuscire a selezionare in ogni popolazione tutti i pazienti BH<sub>4</sub> responsivi e correlare il fenotipo clinico e biochimico con le specifiche mutazioni del gene.

Il test da carico con BH<sub>4</sub> veniva storicamente praticato per la diagnosi di HPA da alterazione dei pathways di biosintesi e rigenerazione del cofattore (Bernegger C et al., 2002). Oggi il test da carico con il cofattore è diventato uno strumento valido per selezionare tutti i pazienti che possono beneficiare della terapia a lungo termine con BH<sub>4</sub> (Shintaku H et al., 2004); esso viene eseguito con diverse modalità sulla base dei livelli plasmatici basali di Phe (Muntau et al., 2002; Zurfluh MR et al., 2006). Considerata l'emivita della BH<sub>4</sub> (di circa 8 ore) i test da carico effettuati finora hanno avuto una durata complessiva compresa tra le 8 e le 24 ore (Zurfluh MR et al., 2006); per ottimizzare il protocollo e per selezionare il maggior numero possibile di pazienti responsivi alla BH<sub>4</sub>, Fiege e collaboratori hanno proposto un test della durata di 48 ore con una somministrazione doppia di BH<sub>4</sub> (Fiege B et al., 2005). Poiché il nostro obiettivo era quello di investigare la responsività alla BH<sub>4</sub> nel maggior numero possibile di pazienti disponibili a sottoporsi al test da carico con il cofattore, abbiamo scelto di utilizzare quest'ultimo test poichè più sensibile e in grado di diagnosticare un numero elevato di *slow-responders*, che prima sfuggivano al test da carico delle 24 ore, permettendo in tal modo di trattare anche questi pazienti con uno schema dietetico meno rigido. Infatti cinque (36%) dei nostri pazienti (pazienti BA, BC, DM, DN e FV), hanno raggiunto una riduzione della Phe plasmatica superiore al 30% rispetto ai livelli basali solo dopo 32 ore dall'inizio del test da carico con BH<sub>4</sub>. Pertanto anche sulla base della nostra esperienza, riteniamo che il test da carico con BH<sub>4</sub> esteso a 48 ore è uno strumento importante per il riconoscimento delle risposte tardive. Nel presente studio, tra i pazienti sottoposti al carico con BH<sub>4</sub> abbiamo due fratelli (pazienti GL e GN) con genotipo [165delT]+[P366H]; per entrambe le mutazioni, così come riportato da Zurflüh MR et al. (2008), la responsività alla BH<sub>4</sub> ancora non è ben definita. Nel nostro studio, entrambi i pazienti sono risultati responsivi alla BH<sub>4</sub> (**Tabella 2**). La percentuale di riduzione massima durante il test da carico con BH<sub>4</sub> è stata del 59% per GN e del 67% per GL; in entrambi i pazienti la monoterapia con BH<sub>4</sub> ha permesso la liberalizzazione della dieta (**Tabella 14**).

Attualmente, non vi è un metodo standardizzato per la classificazione dei diversi fenotipi dell'HPA. Generalmente, i pazienti vengono classificati sulla base dei valori della Phe plasmatica riscontrata prima dell'inizio del trattamento dietetico, mentre in altri casi, essi sono stratificati sulla base della "tolleranza" alla Phe. Nel presente studio, per la classificazione dei pazienti abbiamo utilizzato entrambi i parametri e quando abbiamo

riscontrato delle discrepanze tra essi, abbiamo classificato il paziente dando maggiore importanza alla “tolleranza” alla Phe.

Nel presente studio, tutti pazienti arruolati sono stati caratterizzati dal punto di vista molecolare (Tabella 1). I nostri dati sulla frequenza e sulla distribuzione delle mutazioni nel gene PAH, dimostrano ancora una volta, l’ampia eterogeneità delle mutazioni della PAH nei pazienti con HPA. Nei nostri pazienti, le mutazioni più frequentemente riscontrate sono state: p.L48S, p.R158Q e la p.R261Q.

Tra le mutazioni riscontrate nei nostri pazienti, 3 mutazioni (Q301P, c.707-2delA e la T418I) non sono mai state descritte precedentemente. La mutazione c.707-2delA è stata identificata in un paziente (paziente VR) portatore del genotipo c.[707-2delA]+p.[281L]. La mutazione c.707-2delA potrebbe essere considerata come una mutazione “severa” poiché trattasi di una mutazione di splicing che determina la formazione di una proteina PAH tronca con presunta attività enzimatica residua “nulla”; è noto che la mutazione p.281L presenta un’attività enzimatica residua <1% (Pérez-Dueñas B et al., 2004). In questo paziente, la severità del genotipo sarebbe in accordo con la mancata responsività al test da carico con BH<sub>4</sub> (**Tabella 13 e figura 16**), ma sarebbe incredibilmente discordante con il fenotipo attribuito (HPA tipo III) e con la buona tolleranza alla Phe (630 mg/die di Phe). Pertanto ulteriori studi sono necessari per meglio comprendere la patogenicità e la correlazione genotipo-fenotipo per questa nuova mutazione. Tuttavia, poiché la responsività alla BH<sub>4</sub> in vivo è un fattore prognostico favorevole nei pazienti con HPA, è possibile ipotizzare che il test da carico con BH<sub>4</sub> potrebbe rappresentare un parametro aggiuntivo per la classificazione clinica delle HPA. La seconda mutazione identificata è stata la Q301P. Studi in vitro, hanno mostrato che questa lesione genica determinava la formazione di una proteina mutata con solo il 4.4% di attività enzimatica residua. È interessante notare, che filogeneticamente, la Q301 rappresenta un residuo aminoacidico altamente conservato e che finora, nessuna mutazione è stata riportata in questo codone nel gene PAH umano. La Gln301 è localizzata al centro di una α-elica; pertanto la sostituzione della Gln con la Pro, che è un residuo che interrompe l’α-elica, determinerebbe un drammatico riarrangiamento strutturale. L’alterata espressione e funzione della proteina mutata Q301P, potrebbe essere attribuita alla destabilizzazione del monomero e/o ad un alterato assemblaggio dei monomeri mutati. In vivo, il paziente portatore della mutazione p.Q301P (paziente MG) presentava un fenotipo intermedio di HPA (mild PKU) ed è risultato responsivo alla BH<sub>4</sub>

(**Tabella 10 e figura 14**). Tale fenotipo, potrebbe essere attribuibile alla mutazione L48S, presente sull'altro allele oppure all'effetto stabilizzante della BH<sub>4</sub> sul monomero p.Q301P. Nella nostra casistica, nove pazienti (pazienti PA, CB, DV, DN, VE, GN, GL E MG), durante il test da carico con BH<sub>4</sub>, hanno raggiunto un valore di fenilalaninemia inferiore a 360 µmol/L, suggerendo la possibilità per questi pazienti di una monoterapia con BH<sub>4</sub>. Di questi nove pazienti, in cinque pazienti (pazienti PA, CB, VE, GN, GL), durante il periodo di terapia a lungo termine con BH<sub>4</sub> la sola terapia con BH<sub>4</sub>, è risultata efficace nell'eliminare una dieta a ridotto contenuto di fenilalanina, consentendo in tal modo un significativo miglioramento della qualità di vita di questi pazienti. Inoltre, nel nostro studio, durante il periodo di terapia a lungo termine con la BH<sub>4</sub>, tutti i pazienti trattati hanno presentato un significativo miglioramento della tolleranza alla Phe, consentendo una dieta meno ristretta e quindi un miglioramento della qualità di vita.

È noto attualmente, che nei pazienti affetti da HPA, è fondamentale a tutte le età mantenere basse le concentrazioni plasmatiche di fenilalanina e la BH<sub>4</sub> in alcuni pazienti, potrebbe essere una valida strategia terapeutica per raggiungere tale obiettivo. In alcuni pazienti con forme più lievi di HPA il trattamento con BH<sub>4</sub> ha permesso di sospendere completamente il trattamento dietetico. Nella maggior parte dei pazienti con fenotipo classico responsivi al carico, la terapia con la monoterapia con BH<sub>4</sub> potrebbe non essere sufficiente ma potrebbe necessitare anche della restrizione dietetica. Questo rappresenta comunque un grosso vantaggio poiché la somministrazione di BH<sub>4</sub> offre la possibilità di incrementare la tolleranza alla Phe permettendo ai ragazzi fenilchetonurici di avere una dieta più varia. Questo approccio terapeutico potrebbe anche essere molto utile in caso di PKU materna, poichè il controllo metabolico, necessario per prevenire eventi avversi seri nel nascituro (embriopatia e fetopatia fenilpiruvica) è difficilmente raggiunto e mantenuto per tutto il periodo gestazionale. Comunque la sicurezza della terapia con BH<sub>4</sub> durante la gravidanza non è ancora stata stabilita con certezza.

La BH<sub>4</sub> è stata utilizzata con successo da circa 20 anni nei pazienti con alterazione dei pathways di biosintesi e rigenerazione della BH<sub>4</sub>. Alcuni eventi avversi riportati nella terapia a lungo termine sono: disordini del sonno, poliuria e ridotta consistenza delle feci (Muntau AC et al., 2002). Nella nostra casistica, durante il periodo di trattamento a lungo termine con BH<sub>4</sub>, 2 pazienti hanno presentato epigastralgia e un paziente ha presentato dolore addominale acuto inquadrato poi come un'appendicite.

Fino al 2007, la BH<sub>4</sub> era disponibile solo per scopi di ricerca, limitandone in tal modo l'uso per il trattamento della PKU. A dicembre del 2007, sulla base delle diverse evidenze scientifiche riportate in letteratura sulla efficacia e sulla sicurezza della sapropterina dicloridrato (6R-BH<sub>4</sub>), la Food and Drug Administration (FDA) ha autorizzato la commercializzazione della sapropterina dicloridrato per uso clinico. La sapropterina dicloridrato è una formulazione sintetica dell'isomero attivo della tetraidrobioppterina, nota con il nome di KUVAN (Kuvan®, BioMarin Corporation, Tiburon, CA). Dal 15 Settembre 2009, il Kuvan è ufficialmente disponibile anche in Italia. La sapropterina è il primo trattamento non-dietetico disponibile per pazienti affetti da HPA, sensibili alla tetraidrobioppterina. Con l'autorizzazione all'immissione in commercio della sapropterina dicloridrato, una valida opzione terapeutica si è resa finalmente disponibile per il trattamento delle HPA. In diversi trial effettuati, la sapropterina è risultata essere efficace nel ridurre i livelli plasmatici di Phe in alcuni pazienti con HPA. Per un sottogruppo di pazienti, la sapropterina potrebbe rappresentare l'unico trattamento. Per altri pazienti, il trattamento con sapropterina potrebbe non eliminare completamente la terapia dietetica, ma potrebbe consentire un graduale incremento dell'apporto di fenilalanina con la dieta, e quindi di proteine, migliorando in tal modo la qualità di vita del paziente. Ad oggi, solo un piccolo numero di pazienti e solo per brevi periodi sono stati trattati con la sapropterina, pertanto ulteriori studi sono necessari per stabilirne la sicurezza e l'efficacia a lungo termine.

Nel nostro studio, tutti i pazienti che sono risultati sensibili alla BH<sub>4</sub> hanno iniziato la terapia a lungo termine con BH<sub>4</sub> fornita dalla Schircks Laboratories (Jona, Switzerland).

In conclusione, data la unicità di ogni paziente, è importante effettuare in tutti i pazienti il carico con BH<sub>4</sub> per valutarne la responsività, dato che la risposta alla BH<sub>4</sub> potrebbe dipendere da diversi fattori (Matalon MK et al., 2007). In pazienti selezionati, la terapia a lungo termine con BH<sub>4</sub> è risultata efficace nel garantire un buon controllo metabolico ed un miglioramento della qualità di vita grazie alla liberalizzazione della dieta o ad una dieta meno ristretta.

### 3.13 BIBLIOGRAFIA

Bernegger C and Blau N. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1919 patients observed from 1988 to 2002. *Molecular Genetics and Metabolism* 2002; 77: 304-13.

Blau N, Trefz F. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency: possible regulation of gene expression in a patient with the homozygous L48S mutation. *Mol Genet Metab.* 2002;75:186–7.

Blau N. and Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive Phenylalanine Hydroxylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 82 (2004) 101-111

Blau N. Defining tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness in PKU. *J Inherit Metab Dis.* 2008 Feb;31(1):2-3.

Brown AS, Fernhoff PM, Waisbren SE, Frazier DM, Singh R, Rohr F, Morris JM, Kenneson A, MacDonald P, Gwinn M, Honein M, Rasmussen SA. Barriers to successful dietary control among pregnant women with phenylketonuria, *Genet. Med.* 4 (2002) 84–89.

Burton BK, Grange DK, Milanowski A, Vockley G, Feillet F, Crombez EA, Abadie V, Harding CO, Cederbaum S, Dobbelaere D, Smith A, Dorenbaum A. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. *J Inherit Metab Dis.* 2007 Oct;30(5):700-7.

de Groot MJ, Hoeksma M, Blau N, Reijngoud DJ, van Spronsen FJ. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. *Mol Genet Metab.* 2010;99 Suppl 1:S86-9.

Daniele A, Scala I, Cardillo G, Pennino C, Ungaro C, Sibilio M, Parenti G, Esposito L, Zagari A, Andria G, Salvatore F. Functional and structural characterization of novel mutations and genotype-phenotype correlation in 51 phenylalanine hydroxylase deficient families from Southern Italy. *FEBS J.* 2009 Apr;276(7):2048-59.

Desviat LR, Perez B, Belanger-Quintana A, Castro M, Aguado C, Sanchez A, Garcia MJ, Martinez-Pardo M, Ugarte M. Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. *Mol Genet Metab.* 2004;83:157–62.

Ding Z, Harding CO, Rebuffat A, Elzaouk L, Wolff JA, Thöny B. Correction of murine PKU following AAV-mediated intramuscular expression of a complete phenylalanine hydroxylating system. *Mol Ther.* 2008 Apr;16(4):673-81.

Feillet F, van Spronsen FJ, MacDonald A, Trefz FK, Demirkol M, Giovannini M, Bélanger-Quintana A, Blau N. Challenges and pitfalls in the management of phenylketonuria. *Pediatrics.* 2010 Aug;126(2):333-41. Epub 2010 Jul 12.

Fiege B, Ballhausen D, Kierat L, Leimbacher W, Goriounov D, Schircks B, Thöny B, Blau N. Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration. *Mol Genet Metab.* 2004 Jan;81(1):45-51.

Fiege B, Bonafé L, Ballhausen D, Baumgartner M, Thöny B, Meili D, Fiori L, Giovannini M, Blau N. Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study. *Mol Genet Metab.* 2005 Dec;86 Suppl 1:S91-5

Fiege B, Blau N. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria, *J. Pediatr.* 150 (2007) 627–630.

Gámez A, Wang L, Sarkissian CN, Wendt D, Fitzpatrick P, Lemontt JF, Scriver CR and Stevens RC Structure-based epitope and PEGylation sites mapping of phenylalanine ammonia-lyase for enzyme substitution treatment of phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism* 2007; 91:325-34



Guldborg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, François B, Michiels L, Ullrich K, Hoffmann GF, Burgard P, Schmidt H, Meli C, Riva E, Dianzani I, Ponzzone A, Rey J, Güttler F. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet.* 1998 Oct;63(4):1252-3.

Harding CO. New era in treatment for phenylketonuria: Pharmacologic therapy with sapropterin dihydrochloride. *Biologics.* 2010 Aug 9;4:231-6.

Harding CO, Gibson KM. Therapeutic liver repopulation for phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2010 May 22.

Hegge KA, Horning KK, Peitz GJ, Hegge K. Sapropterin: a new therapeutic agent for phenylketonuria. *Ann Pharmacother.* 2009 Sep;43(9):1466-73.

Huijbregts SC, de Sonnevile LM, van Spronsen FJ, Licht R, Sergeant JA. The neuropsychological profile of early and continuously treated phenylketonuria: orienting, vigilance, and maintenance versus manipulation-functions of working memory. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002;26(6): 697–712

Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P, Scriver CR. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet.* 1997 Dec;61(6):1309-17.

Kim W, Erlandsen H, Surendran S, Stevens R C, Gamez A, Michols-Matalon K, Tying S K and Matalon R. Trends in enzyme therapy for phenylketonuria. *Molecular Therapy* 2004 Aug; 10: 220-4

Koch R, Burton B, Hoganson G, Peterson R, Rhead W, Rouse B, et al. Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *J Inherit Metab Dis.* 2002 Sep;25(5):333-46.

Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y, Narisawa K. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr*. 1999 Sep;135(3):375-8.

Lassker U, Zschocke J, Blau N, Santer R. Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria. Two new cases and a review of molecular genetic findings. *J Inher Metab Dis*. 2002;25:65–70.

Leuzzi V, Carducci C, Carducci C, Chiarotti F, Artiola C, Giovanniello T, Antonozzi I. The spectrum of phenylalanine variations under tetrahydrobiopterin load in subjects affected by phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Inher Metab Dis*. 2006;29:38–46.

Levy HL, Waisbren SE. PKU in adolescents: rationale and psychosocial factors in diet continuation. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 407: 92–97.

**Levy HL**, Burton B, Cederbaum S, Scriver C. Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) in phenylketonuria and its use in treatment. *Mol Genet Metab*. **2007** Dec;92(4):287-91.

**Levy HL**, Milanowski A, Chakrapani A, Cleary M, Lee P, Trefz FK, Whitley CB, Feillet F, Feigenbaum AS, Bebhuk JD, Christ-Schmidt H, Dorenbaum A; Sapropterin Research Group. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH<sub>4</sub>) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. *Lancet*. **2007** Aug 11;370(9586):504-10.

Lindner M, Steinfeld R, Burgard P, Schulze A, Mayatepek E, Zschocke J. Tetrahydrobiopterin sensitivity in German patients with mild phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat*. 2003 Apr;21(4):400.

Martynyuk AE, Glushakov AV, Sumners C, Laipis PJ, Dennis DM, Seubert CN. Impaired glutamatergic synaptic transmission in the PKU brain. *Mol Genet Metab*. 2005;86(suppl 1): S34 –S42

Matalon R, Surendran S, Matalon M, Tying S, Quast M, Jinga W, Ezell E and Szucs S. Future role of large neutral amino acids in transport of phenylalanine into the brain. *Pediatrics* 2003; 112:1570-4

Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G, Grechanina E, Novikov P, McDonald JD, Grady J, Tying SK, Guttler F. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis*. 2006 Dec;29(6):732-8.

Michals-Matalon K, Bhatia G, Guttler F, Tying SK, Matalon R. Response of phenylketonuria to tetrahydrobiopterin. *J Nutr*. 2007 Jun;137(6 Suppl 1):1564S-1567S

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215

Milstien S, Kaufman S. Studies on the phenylalanine hydroxylase system in liver slices. *J. Biol. Chem*. 250 (1975) 4777–4781.7

Muntau AC, Röschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP, Roscher AA. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med*. 2002 Dec 26;347(26):2122-32.

Muntau AC, Gersting SW. Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 2010 Dec;33(6):649-58.

National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Phenylketonuria: screening and management, October 16-18, 2000. *Pediatrics* 2001; 108; 972-982

Neiderwieser A and Curtius HC. Tetrahydrobiopterin deficiencies in hyperphenylalaninemia, in: Bickel H, Wachtel U, Inherited Diseases of Amino Acid Metabolism, Georg Thieme, Stuttgart, 1985, 104-121.

Okano Y, Hase Y, Kawajiri M, Nishi Y, Inui K, Sakai N, Tanaka Y, Takatori K, Kajiwar M, Yamano T. In vivo studies of phenylalanine hydroxylase by phenylalanine breath test: diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Pediatr Res.* 2004 Nov;56(5):714-9.

Pardridge WM. Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res.* 1998 May;23(5):635-44. Review.

Pérez-Dueñas B, Vilaseca MA, Mas A, Lambruschini N, Artuch R, Gómez L, Pineda J, Gutiérrez A, Mila M, Campistol J. Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2004 Dec;37(12):1083-90.

Ponzzone A., Guardamagna O., Ferrarsi S, Ferrero GB, Dianzani I, Cotton RGH. Tetrahydrobiopterin loading test in hyperphenylalaninemia. *Pediatr. Res.* 30 (1991) 435-8.

Sarkissian CN, Gámez A, Wang L, Charbonneau M, Fitzpatrick P, Lemontt JF, Zhao B, Vellard M, Bell SM, Henschell C, Lambert A, Tsuruda L, Stevens RC, Scriver CR. Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 30;105(52):20894-9.

Schweitzer-Krantz S and Burgard P. Survey of national guidelines for the treatment of phenylketonuria. *Eur J Pediatr* (2000) 159 [Suppl 2]: S70- S73

ShintakuH, Kure S, Ohura T, Okano Y, Ohwada M, SugiyamaN, Sakura N, Yoshida I, Yoshino M, et al. Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive

hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene. *Pediatr Res.* 2004;55:425–30.

Scriver C.R., Kaufman S., Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency, In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.); B. Childs, K.W. Kinzler, B. Vogelstein (Assoc. eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8<sup>th</sup> Edition. Vol. 2, New York: McGraw-Hill, 2001:1667–1724.

Somaraju UR, Merrin M. Sapropterin dihydrochloride for phenylketonuria. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Jun 16;(6):CD008005.

Steinfeld R, Kohlschütter A, Ullrich K, Lukacs Z. A hypothesis on the biochemical mechanism of BH(4)-responsiveness in phenylalanine hydroxylase deficiency. *Amino Acids.* 2003 Jul;25(1):63-8.

Thony B, Auerbach G, Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J.* 2000;347( Pt 1):1–16.

**Trefz** FK, Scheible D, Götz H, Frauendienst-Egger G. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* **2009** Feb;32(1):22-6.

Trefz FK, Burton BK, Longo N, Casanova MM, Gruskin DJ, Dorenbaum A, Kakkis ED, Crombez EA, Grange DK, Harmatz P, Lipson MH, Milanowski A, Randolph LM, Vockley J, Whitley CB, Wolff JA, Bebachuk J, Christ-Schmidt H, Hennermann JB; Sapropterin Study Group. Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Pediatr.* 2009 May;154(5):700-7. Epub 2009 Mar 4.

Zurflüh MR, Giovannini M, Fiori L, Fiege B, Gokdemir Y, Baykal T, Kierat L, Gärtner KH, Thöny B, Blau N. Screening for tetrahydrobiopterin deficiencies using dried blood spots on filter paper. *Mol Genet Metab.* 2005 Dec;86 Suppl 1:S96-103. Epub 2005 Nov 7.

Zurflüh MR, Fiori L, Fiege B, Ozen I, Demirkol M, Gärtner KH, Thöny B, Giovannini M, Blau N. Pharmacokinetics of orally administered tetrahydrobiopterin in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2006 Dec;29(6):725-31.

Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, Stevens RC, Thöny B, Blau N. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat*. 2008 Jan;29(1):167-75.

Walter JH, Lee PJ, Burgard P. Hyperphenylalaninaemia. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH: *Inborn Metabolic diseases-4th Edizione*. Springer, 2006; 222-232.

## **APPENDICE DEL PROGETTO 2**



## Functional and structural characterization of novel mutations and genotype–phenotype correlation in 51 phenylalanine hydroxylase deficient families from Southern Italy

Aurora Daniele<sup>1,2,3</sup>, Iris Scala<sup>4</sup>, Giuseppe Cardillo<sup>1,5</sup>, Cinzia Pennino<sup>1</sup>, Carla Ungaro<sup>4</sup>, Michelina Sibilio<sup>4</sup>, Giancarlo Parenti<sup>4</sup>, Luciana Esposito<sup>6</sup>, Adriana Zagari<sup>1</sup>, Generoso Andria<sup>4</sup> and Francesco Salvatore<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CEINGE–Biotecnologie Avanzate Scarl, Naples, Italy

<sup>2</sup> IRCCS – Fondazione SDN, Naples, Italy

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze per la Salute, Università del Molise, Campobasso, Italy

<sup>4</sup> Dipartimento di Pediatria, Università di Napoli 'Federico II', Naples, Italy

<sup>5</sup> Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli 'Federico II', Naples, Italy

<sup>6</sup> CNR – Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, Naples, Italy

### Keywords

BH<sub>4</sub>-responsiveness; hyperphenylalaninemia molecular epidemiology; PAH mutation functional analysis; PAH structural alterations; phenylketonuria

### Correspondence

F. Salvatore, CEINGE Biotecnologie

Avanzate S.C.a r.l., via Comunale

Margherita 482, I-80145 Napoli, Italy

Fax: +39 081 746 3650

Tel.: +39 081 746 4966

E-mail: salvator@unina.it

G. Andria, Dipartimento di Pediatria,

Università di Napoli Federico II, Via Sergio

Pansini, 5, I-80131 Napoli, Italy

Fax: +39 081 746 3116

Tel: +39 081 746 2673

E-mail: andria@unina.it

(Received 1 December 2008, revised 22 January 2009, accepted 29 January 2009)

doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06940.x

Hyperphenylalaninemia (Online Mendelian Inheritance in Man® database: 261600) is an autosomal recessive disorder mainly due to mutations in the gene for phenylalanine hydroxylase; the most severe form of hyperphenylalaninemia is classic phenylketonuria. We sequenced the entire gene for phenylalanine hydroxylase in 51 unrelated hyperphenylalaninemia patients from Southern Italy. The entire locus was genotyped in 46 out of 51 hyperphenylalaninemia patients, and 32 different disease-causing mutations were identified. The pathologic nature of two novel gene variants, namely, c.707-2delA and p.Q301P, was demonstrated by *in vitro* studies. c.707-2delA is a splicing mutation that involves the accepting site of exon 7; it causes the complete skipping of exon 7 and results in the truncated p.T236MfsX60 protein. The second gene variant, p.Q301P, has very low residual enzymatic activity (~4.4%), which may be ascribed, in part, to a low expression level (8–10%). Both the decreased enzyme activity and the low expression level are supported by analysis of the 3D structure of the molecule. The putative structural alterations induced by p.Q301P are compatible with protein instability and perturbation of monomer interactions within dimers and tetramers, although they do not affect the catalytic site. *In vivo* studies showed tetrahydrobiopterin responsiveness in the p.Q301P carrier but not in the c.707-2delA carrier. We next investigated genotype–phenotype correlations and found that genotype was a good predictor of phenotype in 76% of patients. However, genotype–phenotype discordance occurred in approximately 25% of our patients, mainly those bearing mutations p.L48S, p.R158Q, p.R261Q and p.P281L.

Hyperphenylalaninemia (HPA; Online Mendelian Inheritance in Man® database: 261600), which includes phenylketonuria (PKU) at the most severe end of the phenotypic spectrum, is the most common inborn disorder of amino acid metabolism and is caused by a deficiency of phenylalanine hydroxylase

### Abbreviations

BH<sub>4</sub>, 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; HPA, hyperphenylalaninemia; PAH, phenylalanine hydroxylase; PKU, phenylketonuria.



(PAH: EC 1.14.16.1). PAH is a hepatic monooxygenase that catalyses the conversion of L-Phe to L-Tyr using 6*R*-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) as a coenzyme. Deficiency of PAH activity causes accumulation of Phe in tissues and biological fluids, thereby resulting in the formation of secondary neurotoxic metabolites [1,2]. At present, HPA is treated by maintaining strict metabolic control through a Phe-restricted diet. Untreated HPA leads to brain damage and mental retardation and epilepsy, as well as other neurological abnormalities [3]. The severity of PAH deficiency is variable and partly depends on the nature of the mutations of the *PAH* gene. Recently, a novel subtype of PAH deficiency, termed 'BH<sub>4</sub> responsive', was identified, and several *PAH* mutations with residual enzymatic activity have been associated with BH<sub>4</sub> responsiveness [4–6].

The enzyme assembles into homotetramers, with each subunit consisting of three domains: an N-terminal regulatory domain (residues 1–142), a large catalytic domain (residues 143–410) and a C-terminal domain (residues 411–452) that is responsible for tetramerization and includes a dimerization motif (411–426). The *PAH* gene contains 13 exons and maps onto chromosome 12q22–q24.1. To date, more than 500 *PAH* gene mutations have been identified (<http://www.pahdb.mcgill.ca>). Their frequency varies in distinct populations and geographic areas [7–9] and a number of them have been analyzed and characterized *in vitro* [10,11].

Identification of the mutations and subsequent *in vitro* expression studies may help in the prediction of the severity of HPA. In a number of patients, the genotype correlates with the metabolic phenotype [i.e. 'severe' mutations with undetectable PAH activity cause classic PKU (HPA I), whereas 'mild' mutations with some residual PAH activity cause milder forms of the disease (HPA II and HPA III)] [1,2,10]. However, significant inconsistencies among individuals with similar *PAH* genotypes show that the PKU/HPA phenotype is more complex than that predicted by the Mendelian inheritance of defective alleles at the *PAH* locus [12,13]. Subsequent to the 1990s, various studies have addressed the issue of the genotype–phenotype correlation of HPA, but no clear-cut findings have emerged. This most likely reflects the rare nature of the disease, the growing number of mutations and the unpredictable result of allelic complementation in compound heterozygotes [14–18]. Translated into clinical practice, this means that it is often difficult to predict the phenotype on the basis of a patient's genotype, and further studies in different ethnic groups are still warranted.

We have carried out a molecular analysis of the *PAH* gene in 51 unrelated HPA patients from Southern Italy. In addition to the molecular epidemiology of *PAH* mutations, we characterized the functional properties of two novel mutations to investigate their disease-causing nature and tested BH<sub>4</sub> responsiveness in the two carriers of these novel mutations. We also evaluated the genotype–phenotype relationship in homozygous, functional hemizygous and compound heterozygous patients.

## Results

### Molecular epidemiology of PAH mutations

Fifty-one HPA patients were divided into three phenotype classes according to pre-treatment estimation of plasma Phe levels and/or Phe tolerance: 24 patients were classified as HPA I, 17 as HPA II and ten as HPA III. For nine patients (patients 3, 4, 5, 18, 25, 37, 39, 48 and 49), in whom the pre-treatment Phe level was discordant with the Phe tolerance, the phenotype was classified based on dietary tolerance data because blood Phe levels at diagnosis may be influenced by neonatal events such as hypercatabolism (e.g. due to infection) [19].

Complete sequencing of the 13 exons, the intron–exon boundaries and the promoter region of the *PAH* gene was carried out. Complete genotyping was carried out in 46 out of 51 HPA patients; in five patients (HPA II, *n* = 2; HPA III, *n* = 3), only one causative mutation was found (allele detection rate = 95.1%). A total of 32 distinct mutations were identified and these were unevenly distributed along the *PAH* gene sequence (Table 1). Of these, 20 were missense mutations (62%), five were deletions (16%), four were nonsense mutations (13%) and three were at splicing sites (9%). Two mutations had a frequency > 15% (i.e. p.R261Q and c.1066-11G>A; cumulative frequency = 35.3%); four mutations had a frequency in the range 5.0–8.0% (i.e. p.L48S, p.P281L, p.R158Q, c.1055delG; cumulative frequency = 26.5%); seven mutations had a frequency in the range 1.0–3.0% (i.e. c.165delT, p.I94S, c.592\_613del, p.N223Y, p.R252W, p.R261X, p.A403V; cumulative frequency = 14.7%); and the remaining 19 mutations were present in a single mutant allele (0.98% each, cumulative frequency = 18.6%). The majority of mutations (*n* = 25) were distributed along the catalytic domain (78%), whereas six mutations (19%) belonged to the regulatory domain and only one (3%) to the tetramerization domain. Table 1 shows the distribution and frequencies of each mutation in the various alleles, as

**Table 1.** Distribution of mutations along the PAH gene/protein. Novel mutations are highlighted in bold. nt, nucleotide; aa, amino acid.

Protein domains and subdomains containing mutations		Frequency for each mutation (%)				Exon	Frequency for each exon (%)								
		HPA I (48 alleles)	HPA II (34 alleles)	HPA III (20 alleles)	Total (102 alleles)		HPA I (48 alleles)	HPA II (34 alleles)	HPA III (20 alleles)	Total (102 alleles)					
Regulatory Domain nt 1–426 aa 1–142		None	None	None	None	1	0.00	0.00	0.00	0.00					
	c.116–118delTCT (p.F39del)	0.00	2.94	0.00	0.98	2	4.17	14.71	25.00	11.76					
	p.L48S	4.17	8.82	15.00	7.84										
	c.165delT (p.F55LfsX6)	0.00	2.94	10.00	2.94										
	Auto Regulatory Sequence nt 55–99 aa 19–33	p.S67P	2.08	0.00	0.00	0.98	3	2.08	8.82	0.00	3.92				
p.I94S		0.00	5.88	0.00	1.96										
c.284–286delITCA (p.I95del)		0.00	2.94	0.00	0.98										
		None	None	None	None	4	0.00	0.00	0.00	0.00					
Catalytic Domain nt 427–1230 aa 143–410	p.R158Q	4.17	8.82	5.00	5.88	5	4.17	8.82	5.00	5.88					
	c.592–613del22	4.17	0.00	0.00	1.96	6	10.42	2.94	10.00	7.84					
	p. D222G	0.00	2.94	0.00	0.98										
	p.R176X	2.08	0.00	0.00	0.98										
	p.W187X	2.08	0.00	0.00	0.98										
	p.L213P	2.08	0.00	0.00	0.98										
	Cofactor Binding Region #1 nt 733–798 aa 245–266	p.N223Y	0.00	0.00	10.00	1.96	7	39.58	35.29	20.00	34.31				
c.707–2delA (IVS06nt–2delA)		0.00	0.00	5.00	0.98										
Cofactor Binding Region #2 nt 838–849 aa 280–283	p.R241C	0.00	0.00	5.00	0.98	8						0.00	2.94	0.00	0.98
	p.R243X	2.08	0.00	0.00	0.98										
	p.R252W	4.17	0.00	0.00	1.96										
	p.R261Q	18.75	26.47	5.00	18.63										
Cofactor Binding Region #3 nt 964–978 aa 322–326	p.R261X	4.17	0.00	0.00	1.96	9						0.00	0.00	5.00	0.98
	p. E280K	2.08	0.00	0.00	0.98										
	p.P281L	6.25	8.82	5.00	6.86										
	c.842+3G>C (IVS07nt3G>C)	2.08	0.00	0.00	0.98										
Cofactor Binding Region #4 nt 1129–1137 aa 377–379	p.Q301P	0.00	2.94	0.00	0.98	10	0.00	2.94	0.00	0.98					
	p.I306V	0.00	0.00	5.00	0.98	11	0.00	0.00	5.00	0.98					
	c.1055delG	10.42	2.94	0.00	5.88	12	0.00	5.88	10.00	3.92					
Key aa in CBR G247; L249; S251; F254; H264; E286; A322; Y325	p.G352fs	0.00	2.94	0.00	0.98	10	10.42	5.88	0.00	6.86					
	p.D338Y	0.00	2.94	0.00	0.98										
	c.1066–11G>A (IVS10nt–11G>A)	29.17	8.82	0.00	16.67										
	Fe(III) binding aa H285; H290; E330	p.P366H	0.00	0.00	5.00	0.98	11	29.17	8.82	10.00	18.63				
p.E390G		0.00	0.00	5.00	0.98										
p.A403V		0.00	0.00	10.00	1.96										
p.R408Q		0.00	2.94	0.00	0.98										
Tetramerization Domain nt 1231–1356 aa 411–452	p.Y414C	0.00	2.94	0.00	0.98	12	0.00	5.88	10.00	3.92					
		None	None	None	None	13	0.00	0.00	0.00	0.00					
	Detection Rate	100.00	94.12	85.00	95.10		100.00	94.12	85.00	95.10					
	Unknown	0.00	5.88	15.00	4.90		0.00	5.88	15.00	4.90					

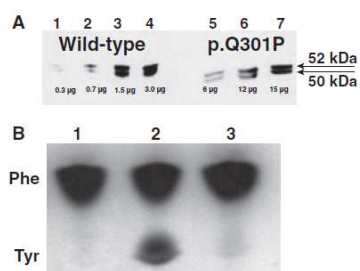
well as the frequency for each exon, in our 51 patients in relation to the degree of phenotypic severity.

When phenotypic classes were considered, c.1066–11G>A was the most frequent mutation in group HPA I (29.17%), p.R261Q was prevalent in both HPA I (18.75%) and HPA II (26.47%) and p.L48S was the most frequent mutation in group HPA III (15.00%). Thirty-one unrelated patients had at least one mutation that was described previously as being BH<sub>4</sub> responsive [11,20,21]. In detail, at least one BH<sub>4</sub> responsive allele was present in ten HPA I patients, 14 HPA II patients and seven HPA III patients.

#### Characterization and functional analysis of novel mutations

Among the mutations identified in our HPA population, two (i.e. p.Q301P and c.707–2delA) were novel. One of these mutations, p.Q301P, arises from the c.911A>C transversion in exon 8. This mutation is located in the catalytic domain. The expression of the p.Q301P mutant enzyme was decreased. As shown by western blotting (Fig. 1A), in the presence of anti-PAH serum, the intensity of the band corresponding to the 50 kDa monomeric form of the mutant enzyme

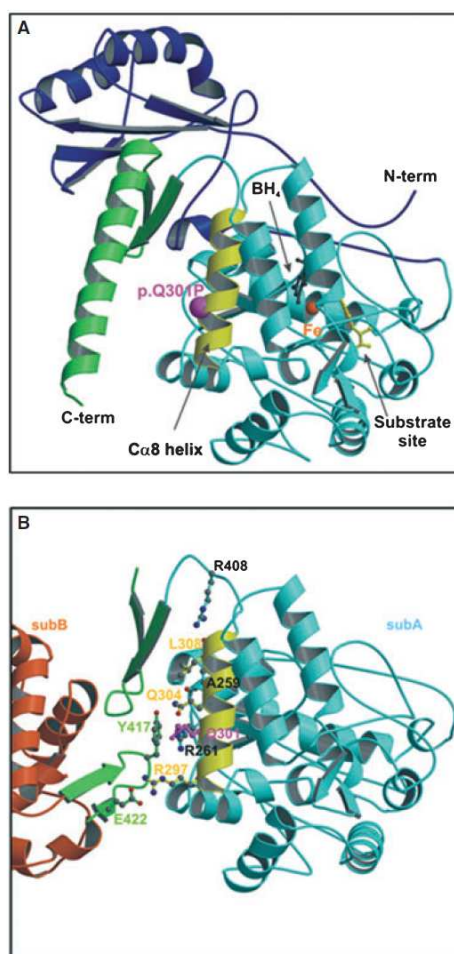




**Fig. 1.** (A) Western blot analysis performed on transfected human HEK293 cells. A 50 kDa band was detected on immunoblots with increasing amounts ( $\mu\text{g}$ ) of cell protein extract after transfection with wild-type PAH (lanes 1–4) and with p.Q301P plasmid (lanes 5–7). Densitometric analysis (see Experimental procedures) allowed quantification of the difference, which revealed an average of approximately 8–10% in the mutant compared to the wild-type protein in repeated experiments ( $n = 7$ ). (B) PAH enzyme activities of wild-type and mutant p.Q301P in transfected HEK293 cells assayed by measuring the conversion of  $\text{L-[}^{14}\text{C]Phe}$  to  $\text{L-[}^{14}\text{C]Tyr}$  using the natural cofactor  $\text{BH}_4$  (see Experimental procedures). Lane 1, untransfected control; lane 2, wild-type; lane 3, p.Q301P.

was approximately ten-fold lower in total extracts from p.Q301P-transfected cells (lanes 5–7) compared to wild-type extracts (lanes 1–4) (the PAH protein was absent in the untransfected cells). To evaluate the effect of this mutation on catalytic activity, we tested the functionality of the p.Q301P mutated protein in three independent experiments (Fig. 1B): the residual enzyme activity measured on total protein extracts from transfected cells was 4.4% (range 3.6–4.9%) of the wild-type enzyme activity. No PAH activity was detected in the untransfected cells (Fig. 1B, lane 1).

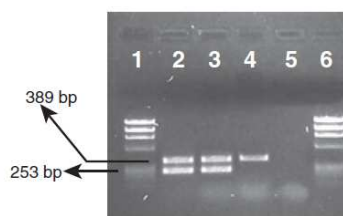
In an attempt to account for the low expression level and the decreased enzymatic activity of the p.Q301P variant, we analyzed the putative alterations produced by mutation in the 3D structure of the ternary complex as constituted by the PAH enzyme, the  $\text{BH}_4$  cofactor and thienylalanine, which is a substrate analog. Human PAH is a homotetramer, with each subunit consisting of three domains: an N-terminal regulatory domain (residues 1–142), a catalytic domain (residues 143–410) and a C-terminal domain, which is responsible for oligomerization (residues 411–452). The ternary complex that we used as a reference structure contains only the catalytic domain and the dimerization motif (residues 411–425). In addition to shedding light on the overall architecture of domain organization, this analysis revealed fine details of substrate and cofactor binding sites (Fig. 2). Mutation p.Q301P falls in the catalytic domain but is far from the active and



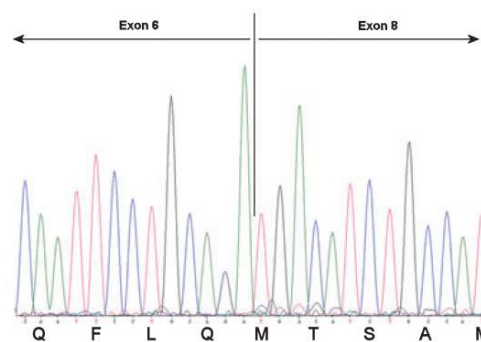
**Fig. 2.** (A) Schematic representation of the PAH composite monomeric model. The catalytic domain, the regulatory domain and the tetramerization domain are shown in cyan, blue and green, respectively; the Ca8 helix is highlighted in yellow. The localization of the Q301P mutation is represented by a magenta sphere.  $\text{BH}_4$  cofactor is shown in gray, thienylalanine in yellow and the Fe ion as an orange sphere. (B) Local environment of residue Q301 (magenta) in the human dimeric truncated structure (Protein databank code: 1mmk). The catalytic domains of subunits A and B are colored cyan and orange, respectively, whereas the dimerization motifs of both subunits are colored green. The Ca8 helix is highlighted in yellow. Interacting residues are shown as ball-and-stick models (sticks of residues belonging to Ca8, to subunit A and to subunit B are drawn in yellow, cyan and green, respectively). For interaction details, see text.

cofactor sites. The Gln residue belongs to the C $\alpha$ 8 helix (residues 293–310, notation according to [22]) and its polar side chain protrudes into the solvent (Fig. 2A). The C $\alpha$ 8 helix contributes to stabilization of the tertiary structure of the monomer because it is connected, via H-bonds, to other segments within the subunit (Gln304–Ala259, Gln304–Arg261, Leu308–Arg408) (Fig. 2B). The replacement of a hydrophilic Gln with a rigid Pro residue at the center of the C $\alpha$ 8 helix markedly disturbs the structure of the helix itself. Indeed, if not breaking the helix architecture, a Pro residue at least causes the formation of a kink. Helix bending angles induced by Pro residues could be up to 20–30°. A distortion of this entity would severely perturb the helix structure, as well its orientation, and hence perturb the tertiary structure. In addition, the helix faces the dimerization motif of an adjacent subunit and thus contributes to stabilizing the intersubunit interface. Indeed, the Arg297 and Gln304 side chains of the C $\alpha$ 8 helix make favorable interactions with the Glu422 and Tyr417 side chains of a neighboring subunit (Fig. 2B).

The second mutation, c.707-2delA, is a splicing mutation of the accepting site of exon 7. Figure 3 reports the results of the nested PCR (see Experimental procedures), which reveal a 389 bp fragment of the expected length in all members of the analyzed family and a shorter fragment of 253 bp present only in the proband, as well as in his mother who bears the same mutation (Fig. 3). Direct sequencing of both cDNA bands confirmed the skipping of the whole 136 bp exon 7 and showed an altered junction between exons 6 and 8 (Fig. 4). This process causes a new ORF containing a frameshift, which results in the truncated p.T236MfsX60 protein due to a premature termination after 60 codons. Therefore, we were unable to carry out a functional study of this variant protein.



**Fig. 3.** Nested RT-PCR showing exon 7 skipping for the c.707-2delA mutation. Lanes 1 and 6, DNA size marker IX ( $\phi$ X174, *Hae*III digested); lane 2, mother; lane 3, affected child; lane 4, father; lane 5, negative control (water).



**Fig. 4.** Sequence electropherogram of the purified lowest RT-PCR band in Fig. 3. The vertical bar indicates the aberrant junction between exons 6 and 8.

### Genotype–phenotype correlation

We examined correlations between genotype and phenotype. The phenotypic class was well predicted from the genotype in 35 of the 46 patients for whom we had complete genotyping data (76%). This observation is in accordance with the 79% correlation rate reported in a previous European study [23]. Nine patients had a homozygous genotype (Table 2). Among them, six patients carried mutations p.R252W, c.1055delG, c.1066-11G>A and c.592-613del22 (patients 6–9, 22 and 23) and presented an HPA I phenotype, in agreement with the absent or very low enzymatic activity associated with these mutations [12,21,24]. By contrast, homozygosity for p.R261Q (patients 10 and 11) was associated with different phenotypic classes, namely HPA I and HPA II, respectively (Table 2).

Among the functional hemizygotes and compound heterozygotes, four patients had the p.[R261Q]+c.[1066-11G>A] genotype (patients 15–18): three were HPA I and one was HPA II. Three patients had the p.[R261Q]+[P281L] genotype (patients 12–14): one was HPA I and the other two were HPA II. Three patients had the p.[L48S]+[R261Q] genotype (patients 1–3): one was HPA III and the other two were HPA I. Two patients had the p.[L48S]+[R158Q] genotype (patients 4 and 5): one was HPA II, the other was HPA III. Finally, it is interesting to note that the patient carrying the novel c.707-2delA mutation in association with the severe p.P281L mutation displayed an HPA III phenotype (patient 39), indicating that the c.707-2delA mutation may allow some residual enzymatic activity (Table 2) although the possibility of inter-allelic complementarity is unlikely [18].



Guldberg *et al.* [23] suggested that, in the heterozygous state, the milder *PAH* mutation may play a major role in the phenotypic outcome; however, in some cases, the metabolic phenotype is not consistent with the predicted genotypic effect. In fact, the 'mild' p.R261Q mutation in combination with the putative null mutations, p.P281L, c.1066-11G>A and c.842+3G>C, was associated with HPA I (patients 12, 15–17 and 35). In addition, the p.R158Q mutation, which has 10% residual enzymatic activity, conferred a severe phenotype in two patients bearing, on the other allele, the nonsense p.R176X and the splice site c.1066-11G>A mutation, respectively (patients 31 and 34).

Finally, an unexpected severe HPA I phenotype was observed in two patients with the p.[L48S]+[R261Q] genotype (patients 1 and 2), in which both mutations display residual enzymatic activity > 25% [24].

To conclude, we acknowledge that the metabolic phenotype of our patients is not completely consistent with that expected according to the genotype-based prediction proposed by Guldberg *et al.* [23].

#### BH<sub>4</sub> responsiveness in novel mutations carriers

We tested BH<sub>4</sub> responsiveness in the two HPA patients, one bearing mutation p.Q301P and the other bearing mutation c.707-2delA (i.e. the two new mutations). The first subject had the p.[L48S]+[Q301P] genotype and a clinical diagnosis of HPA II. The BH<sub>4</sub> loading test showed BH<sub>4</sub> responsiveness with a decline of plasma Phe by more than 30% at T<sub>32</sub> and by 77.1% at T<sub>48</sub>, as predicted by the allelic combination. The second subject was classified as HPA III, carried the p.[P281L]+c.[707-2delA] genotype and showed no response to BH<sub>4</sub> administration.

#### Discussion

There is no standardized method for the classification of HPA phenotypes. Patients are generally classified according to the pre-treatment plasma Phe concentration [25], whereas, in other cases, they are stratified on the basis of Phe tolerance [24,26]. In the present study, we used both parameters and, when there was a discrepancy between the two, we classified the phenotype based on Phe tolerance.

The present study enlarges the molecular epidemiology of *PAH* mutations, particularly with respect to Southern Italy. Our data on the frequency and distribution of *PAH* gene mutations reinforce the wide heterogeneity of *PAH* mutations in HPA patients [7–9]. Nonetheless, exons 2, 6, 7, 10 and 11 bear the majority of mutations (overall frequency = 78%) and should

be screened first in our population, whereas exon 13 shows no mutations in our series.

Two mutations (c.707-2delA and p.Q301P) have not been reported previously. The c.707-2delA mutation was identified in a patient bearing the c.[707-2delA]+p.[P281L] genotype. The c.707-2delA mutation can be considered as 'severe' because it is a splicing mutation that leads to a truncated PAH protein with presumed null enzymatic activity; p.[P281L] has < 1% residual enzymatic activity [24]. The severity of the genotype is in agreement with the lack of BH<sub>4</sub> responsiveness in the BH<sub>4</sub> loading test, but is surprisingly discordant with the good dietary tolerance (630 mg·day<sup>-1</sup> of Phe) according to which an HPA III phenotype was attributed. Further investigations are warranted to clarify this point. However, in this context, it is conceivable that, because BH<sub>4</sub> responsiveness *in vivo* is a favorable prognostic indicator in HPA patients, this test may represent an additional parameter in the clinical classification of HPA.

The second mutation, p.Q301P, was found in a compound heterozygous patient affected by an HPA I phenotype and bearing the p.L48S mutation on the other allele. The change leads to a protein with 4.4% residual enzyme activity and 8–10% residual expression, both tested *in vitro*. Two mechanisms appear to occur with this mutant protein: a lower stability that diminishes the protein level in the cell environment and a misfolding/destabilization of the tetrameric/dimeric structure, which impairs the catalytic function of the molecule. In this regard, it is noteworthy that Q301 is a phylogenetically highly conserved residue and that no mutation has been reported so far at this codon in the human *PAH* gene. Gln301 is located in the middle of an  $\alpha$ -helix; hence, its replacement by Pro, an  $\alpha$ -helix breaker residue, results in a drastic structural re-arrangement. Such a distortion might affect the structure and orientation of the C $\alpha$ 8 helix, which contains residues (i.e. R297 and Q304) anchoring a neighboring subunit, thereby stabilizing the dimer interface. The altered expression and function of the p.Q301P mutant protein may be attributed to destabilization of the monomer and/or to an altered oligomeric assembly. At the molecular level, the PAH tetramer may be formed from various combinations of mutated alleles. Homo- and heterotetramers can be formed at different ratios depending on the effects produced by mutations (i.e. folding defects, reduced stability or low levels of expression) [18]. Being embodied in homo- or heterotetrameric proteins, the resulting enzyme may influence the overall *in vivo* activity [18]. *In vivo*, the patient bearing mutation p.Q301P presents an HPA II phenotype and is BH<sub>4</sub> responsive. This

**Table 2.** Genotype–phenotype correlation or discordance in HPA patients. Patients sharing the same genotype are separated by lines. Rows in which there are novel mutation-containing genotypes are highlighted in bold. PUD, Phe unrestricted diet.

Patient	Genotype		Phenotype		
	Allele 1	Allele 2	Pre-treatment Phe levels ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>	Phe tolerance ( $\text{mg}\cdot\text{day}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	Clinical phenotypes
1	p.L48S <sup>a</sup>	p.R261Q <sup>a</sup>	1250	270	HPA I
2	p.L48S <sup>a</sup>	p.R261Q <sup>a</sup>	1331	300	HPA I
3	p.L48S <sup>a</sup>	p.R261Q <sup>a</sup>	907	1100	HPA III
4	p.L48S <sup>a</sup>	p.R158Q <sup>a</sup>	1331	440	HPA II
5	p.L48S <sup>a</sup>	p.R158Q <sup>a</sup>	2226	650	HPA III
6	c.1066-11G>A	c.1066-11G>A	1670	230	HPA I
7	c.1066-11G>A	c.1066-11G>A	1543	250	HPA I
8	c.1055delG	c.1055delG	1512	250	HPA I
9	c.1055delG	c.1055delG	4090	295	HPA I
10	p.R261Q <sup>a</sup>	p.R261Q <sup>a</sup>	1760	270	HPA I
11	p.R261Q <sup>a</sup>	p.R261Q <sup>a</sup>	1168	410	HPA II
12	p.R261Q <sup>a</sup>	p.P281L	1270	280	HPA I
13	p.R261Q <sup>a</sup>	p.P281L	1089	395	HPA II
14	p.R261Q <sup>a</sup>	p.P281L	1180	410	HPA II
15	p.R261Q <sup>a</sup>	c.1066-11G>A	1815	265	HPA I
16	p.R261Q <sup>a</sup>	c.1066-11G>A	1694	340	HPA I
17	p.R261Q <sup>a</sup>	c.1066-11G>A	1512	330	HPA I
18	p.R261Q <sup>a</sup>	c.1066-11G>A	1875	440	HPA II
19	p.R261X	c.1066-11G>A	2178	320	HPA I
20	p.R261X	c.1066-11G>A	2202	320	HPA I
21	p.I94S <sup>a</sup>	p.I94S <sup>a</sup>	630	540	HPA II
22	c.592_613del22	c.592_613del22	4840	340	HPA I
23	p.R252V	p.R252V	1210	280	HPA I
24	p.L48S <sup>a</sup>	p.D222G <sup>a</sup>	640	450	HPA II
<b>25</b>	<b>p.L48S<sup>a</sup></b>	<b>p.Q301P</b>	<b>2117</b>	<b>385</b>	<b>HPA II</b>
26	p.L48S <sup>a</sup>	p.A403V <sup>a</sup>	242	PUD	HPA III
27	p.A403V <sup>a</sup>	p.R241C <sup>a</sup>	254	PUD	HPA III
28	c.165delIT	c.284_286delITCA <sup>a</sup>	986	500	HPA II
29	c.165delIT	p.N223Y <sup>a</sup>	393	PUD	HPA III
30	c.165delIT	p.P366H	550	1920	HPA III
31	p.R158Q <sup>a</sup>	p.R176X	2874	300	HPA I
32	p.R158Q <sup>a</sup>	p.R261Q <sup>a</sup>	1186	400	HPA II
33	p.R158Q <sup>a</sup>	p.D338Y <sup>a</sup>	700	505	HPA II
34	p.R158Q <sup>a</sup>	c.1066-11G>A	1210	330	HPA I
35	p.R261Q <sup>a</sup>	c.842+3G>C	2148	340	HPA I
36	p.R261Q <sup>a</sup>	p.R408Q <sup>a</sup>	605	440	HPA II
37	p.R261Q <sup>a</sup>	c.1055delG	1270	550	HPA II
38	p.P281L	p.W187X	1815	310	HPA I
<b>39</b>	<b>p.P281L</b>	<b>c.707-2delA</b>	<b>1512</b>	<b>630</b>	<b>HPA III</b>
40	c.1066-11G>A	p.P281L	1428	200	HPA I
41	c.1066-11G>A	c.116_118delITCT	1180	390	HPA II
42	c.1066-11G>A	p.L213P	1936	330	HPA I
43	c.1066-11G>A	p.R243X	2529	275	HPA I
44	c.1066-11G>A	p.E280K	1936	310	HPA I
45	c.1066-11G>A	p.Y414C <sup>a</sup>	1089	400	HPA II
46	p.S67P	c.1055delG	1230	330	HPA I
47	p.N223Y <sup>a</sup>	Unknown	327	PUD	HPA III



**Table 2.** (Continued).

Patient	Genotype		Phenotype		
	Allele 1	Allele 2	Pre-treatment Phe levels ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>	Phe tolerance ( $\text{mg}\cdot\text{day}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	Clinical phenotypes
48	p.R261Q <sup>a</sup>	Unknown	3872	360	HPA II
49	p.P281L	Unknown	1815	400	HPA II
50	p.I306V	Unknown	423	PUD	HPA III
51	p.E390G <sup>a</sup>	Unknown	454	650	HPA III

<sup>a</sup> BH<sub>4</sub> responsive mutation [11,20,21]. <sup>b</sup> Diagnostic cut-off values are reported in the Experimental procedures.

phenotype may be attributable either to the L48S allele or to the stabilizing effect of BH<sub>4</sub> on the p.Q301P monomer. A simple correlation between the *PAH* genotype and phenotype should be predicted on the basis of the monogenic nature of the disorder, as was the case in 76% of our patients. In the remaining cases, there was a discordance between genotype and phenotype. In addition to the present study, several other studies have reported unexpected genotype–phenotype inconsistencies [12,27–31]. Four factors may contribute to this observation: possible phenotypic misclassifications, incorrect tolerance assessment, the unpredictable result of allelic complementation in heterozygous patients, and the role of modifier genes, including cellular quality control systems [23,32]. In the various classification systems, the phenotypic classes of HPA are defined by arbitrary cut-offs, whereas HPA phenotypes represent a continuum. At the same time, tolerance assessment depends on the upper serum Phe level that is considered to be safe and the age of patients in relation to periods of growth fluctuations. Regarding allelic complementation, in heterozygotes, two different mutant monomers interact to constitute the PAH tetramer, and the functional result of this interaction is not always predictable. Finally, phenotypic variability among subjects bearing the same genotype may depend on inter-individual differences, including the handling of folding mutants by chaperones and proteases [32].

In our series, the p.L48S, p.R158Q and p.R261Q mutations were over-represented among patients with inconsistent genotype–phenotype correlations. Mutation p.L48S was shown to produce a protein *in vitro* that underwent accelerated proteolytic action, as revealed by pulse-chase studies [33]. Interestingly, the p.R158Q and p.P281L mutations increase the proportion of aggregates and produce less PAH tetramer [34], whereas the p.R261Q mutation produces a well known folding defect. Residue R261 plays a structural role [22] in that it contributes to the stabilization of the tertiary structure of the catalytic domain

through a connection of different secondary structure elements. Indeed, the R261 side chain binds to Gln304 and Thr238 by H-bonds [35,36]. It is known that the L-Phe substrate activates the enzyme by cooperative homotropic binding. This binding induces conformational changes that are transmitted throughout the enzyme via hinge-bending motions [37,38]. The R261Q recombinant variant exhibits a loss of cooperativity [36]; therefore, the R to Q substitution may prevent the enzyme from undergoing the correct conformational change required by cooperative substrate binding. In addition to p.R261Q, Phe levels may also modulate other mutations that are frequently involved in genotype–phenotype discordance. Hence, the discrepancies observed in our patients corroborate the notion that certain *PAH* mutations confer different phenotypes according to their peculiar molecular properties. Our results also shed some light on the fine molecular alteration occurring at the enzyme level and its consequences within the phenotype. The study of the novel mutation p.Q301P extends the number of cases in which the alteration does not affect the catalytic site but disrupts monomer or dimer stability.

## Experimental procedures

### Subjects

Fifty-one Caucasian HPA unrelated patients from Southern Italy (98% from the Campania region; median age 15 years, range 2–25 years; male : female ratio 1.2 : 1) were investigated. Patients were classified on the basis of pre-treatment plasma Phe concentrations and Phe tolerance into HPA I or ‘classic PKU’ (pre-treatment Phe levels > 1200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Phe tolerance: 250–350  $\text{mg}\cdot\text{day}^{-1}$ ); HPA II (pre-treatment Phe levels in the range 600–1200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Phe tolerance: 350–600  $\text{mg}\cdot\text{day}^{-1}$ ); and HPA III (pre-treatment Phe levels < 600  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Phe tolerance: > 600  $\text{mg}\cdot\text{day}^{-1}$ ). The HPA III category included five patients whose Phe levels were < 360  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  under a Phe unrestricted diet. Phe

tolerance was defined in patients > 2 years of age as the highest Phe intake that was able to maintain plasma Phe levels within the safe range ( $120\text{--}360\text{ mmol L}^{-1}$ ) [23]. In the case of discrepancies between pre-treatment plasma Phe concentrations and Phe tolerance, the phenotypic class was assigned according to Phe tolerance data. Forty-nine patients were identified by a neonatal screening program and two patients who were born in the pre-screening era were diagnosed after the identification of mental retardation. The study was approved by the local ethics committee and performed according to the standards set by the Declaration of Helsinki. The experiments were undertaken with the understanding and written consent of all subjects or their guardians.

### Genotype–phenotype correlation

For the genotype–phenotype analysis, mutations were classified according to the predicted residual enzymatic activity *in vitro*. Functional hemizygotes were defined as having one mutation with zero enzymatic activity. Genotype–phenotype correlation in compound heterozygous patients was carried out in accordance with the ‘quasi-dominant’ theory proposed by Guldberg *et al.* [23], in which the milder mutation of two mutations is assumed to influence the phenotypic outcome.

### BH<sub>4</sub> loading test

BH<sub>4</sub> responsiveness was tested by an extended BH<sub>4</sub> loading test in the two patients bearing the novel mutations [26]. Two weeks before and during the testing period, Phe intake was equally distributed throughout the day. The BH<sub>4</sub> loading test was performed with two  $20\text{ mg kg}^{-1}$  oral doses of BH<sub>4</sub> tablets (Schircks Laboratories, Jona, Switzerland) at  $t_0$  and  $t_{24}$  h. Plasma Phe was analysed at  $t_0$ ,  $t_4$ ,  $t_8$ ,  $t_{12}$ ,  $t_{24}$ ,  $t_{32}$  and  $t_{48}$ . The test was considered to be positive when the initial plasma Phe levels decreased by at least 30% during the test. Plasma Phe concentrations were determined by a Biochrom 30 amino acid analyser (Biochrom Ltd, Cambridge, UK).

### DNA extraction, PCR and sequence analysis

A blood sample (5 mL) was collected by venipuncture into EDTA. DNA was extracted using a standard salting out/ethanol precipitation protocol. We used a home-made primer set that enabled all exons and the promoter to be amplified by a single PCR protocol. The primers and PCR protocol are available upon request. Sequence analysis was performed on both strands with an automated procedure using the 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All PCR fragments were sequenced employing the same primers used in PCR amplification.

### Mutagenesis

PAH mutant constructs were derived from the wild-type PAH expression plasmid pcDNA3, kindly provided by P. Knappskog (University of Bergen, Norway) and P. Waters (McGill University-Montreal Children's Hospital Research Institute, Montreal, Canada). The mutation was introduced into the wild-type expression plasmid using the mutagenic primer and the Transformer II kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA). The resulting clones were sequenced to verify the introduction of each single mutation.

### Expression studies

Ten micrograms of wild-type or mutant cDNA expression vectors were introduced into  $1.6 \times 10^6$  of human HEK293 cells using calcium phosphate (ProFection® Mammalian Transfection System-Calcium Phosphate; Promega Italia, Milan, Italy). Forty-eight hours after transfection, the cells were harvested by trypsin treatment, washed twice with 150 mM NaCl, resuspended in the same buffer and frozen-thawed six times. All transfections were performed in triplicate. Each triplicate was assayed for total protein content using a protein assay kit (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). We co-transfected 10 µg of a construct carrying a β-galactosidase reporter gene as a control for transfection efficiency. Forty-eight hours after transfection, total RNA was isolated using a standard protocol and RT-PCR analysis was performed using specific primers; the resulting cDNAs were sequenced. Immunoblotting experiments were performed using 10 µg of protein extracts electrophoresed on a 10% SDS/PAGE gel, as described previously [39].

The western blot autoradiography was digitalized in a 1200 d.p.i. TIFF image. The image was elaborated using the open source software GIMP, version 2.6 (<http://www.gimp.org/>). The image was grayscaled, so that each pixel ranged between 0 (pure black) and 255 (pure white). Each band was selected using the fuzzy select tool in GIMP with the ‘Feather Edges’ option checked. Then, using the histogram dialog tool, we obtained information about the statistical distribution of color values in the area selected by the fuzzy select tool. Two parameters were taken in account: the pixel count and mean value. The pixel count was divided by the mean value (pixel ratio): the greater the mean value, the fainter the band.

### Enzyme analysis

For each transfection, PAH activity was assayed on 50 µg of protein, in duplicate, as described previously [11]. This test measures the amount of  $^{14}\text{C}$ -radiolabeled Phe converted to Tyr; both residues were subsequently separated by TLC. The enzyme activity of the wild-type and mutant PAH constructs was measured; the mean PAH activities were



calculated from the three sets of transfection data. The residual activities of mutant PAH enzymes were expressed as a percentage of wild-type enzyme activity and normalized to transfection efficiencies based on replicate  $\beta$ -galactosidase activities.

### Molecular graphics

The effect of mutation p.Q301P on the 3D structure was investigated. No crystal structure of any full-length dimeric/tetrameric PAH is available, but various structures of truncated human and rat proteins have been determined. To obtain a complete view of the mutation site in relation to the three protein domains (catalytic, regulatory and tetramerization domains), a composite full-length monomeric model was built from human and rat structures (Protein databank codes: 1mmk [40], 1phz [41], 2pah [42]) according to Erlandsen and Stevens [22]. The details of the interactions displayed by residues in the neighborhood of Q301 were analyzed in the structure of the ternary complex of human PAH with BH<sub>4</sub> and thienylalanine, which consists of only the catalytic domain and dimerization motif (Protein databank code: 1mmk). An analysis of the mutation site was carried out with O software [43].

### Isolation of RNA and RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from leucocytes by centrifugation at 300 g for 5 min; the cells were lysed with TRIzol reagent by repetitive pipetting (TRIzol®, Invitrogen S.r.l., S. Giuliano Milanese, Milan, Italy), the quality of the RNA was monitored by examination of the 18S and 28S ribosomal RNA bands after electrophoresis. The RNA was quantified by spectrophotometry at 260 nm and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA using a standard protocol. Then, a nested PCR was implemented to highlight the PAH cDNA. The first PCR was carried out using the primer pairs: forward, 5'-TAGCCTGCCTGCTGACAA-3', and reverse, 5'-TTTGATGGCTGCTTCTC-3'. In the nested PCR, the primers pair used were: forward, 5'-CCCTCGAGTGGAATACATGG-3', and reverse, 5'-GGAAACTGGGCAAAGCTG-3'. The DNA fragments of 389 bp and a 253 bp were purified and subsequently sequenced.

### Acknowledgements

This study was supported by grants from Regione Campania (Convenzione CEINGE-Regione Campania, G.R. 27/12/2007), from Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca-Rome PS35-126/IND, from IRCCS – Fondazione SDN, and from Ministero Salute, Rome, Italy. The study was partly supported by Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA grant

FARM5MATC7), Rome, Italy. We thank Jean Ann Gilder for revising and editing the text and Anna Nastasi for her skilful contribution to diet assistance in the diseased children.

### References

- 1 Scriver CR & Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn (Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC & Woo SLC, eds), pp. 1667–1724. McGraw-Hill, New York, NY.
- 2 Scriver CR (2007) The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat* **28**, 831–845.
- 3 Giovannini M, Verduci ME, Salvatici E, Fiori L & Riva E (2007) Phenylketonuria: dietary and therapeutic challenges. *J Inherit Metab Dis* **30**, 145–152.
- 4 Leuzzi V, Carducci C, Carducci C, Chiarotti F, Artioli C, Giovannello T & Antonozzi I (2006) The spectrum of phenylalanine variations under tetrahydrobiopterin load in subjects affected by phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Inherit Metab Dis* **29**, 38–46.
- 5 Levy HL, Milanowski A, Chakrapani A, Cleary M, Lee P, Trefz FK, Whitley CB, Feillet F, Feigenbaum AS, Bechuk JD *et al.* (2007) Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH<sub>4</sub>) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. *Lancet* **370**, 504–510.
- 6 Burton BK, Grange DK, Milanowski A, Vockley G, Feillet F, Crombez EA, Abadie V, Harding CO, Cederbaum S, Dobbelaere D *et al.* (2007) The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multi-centre, open-label, screening study. *Inherit Metab Dis* **30**, 700–707.
- 7 Giannattasio S, Dianzani I, Lattanzi P, Spada M, Romano V, Cali F, Andria G, Ponzzone A, Marra E & Piazza A (2001) Genetic heterogeneity in five Italian regions: analysis of PAH mutations and minihaplotypes. *Hum Hered* **52**, 154–159.
- 8 Zschocke J (2003) Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat* **21**, 345–356.
- 9 Daniele A, Cardillo G, Pennino C, Carbone MT, Scognamiglio D, Corrao A, Pignero A, Castaldo G & Salvatore F (2007) Molecular epidemiology of phenylalanine hydroxylase deficiency in Southern Italy: a 96% detection rate with ten novel mutations. *Ann Hum Genet* **71**, 185–193.
- 10 Waters PJ (2003) How PAH gene mutations cause hyper-phenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression. *Hum Mutat* **21**, 357–369.

- 11 Daniele A, Cardillo G, Pennino C, Carbone MT, Scognamiglio D, Esposito L, Corra A, Castaldo G, Zagari A & Salvatore F (2008) Five human phenylalanine hydroxylase proteins identified in mild hyperphenylalaninemia patients are disease-causing variants. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 378–384.
- 12 Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, Byck S, Nowacki P & Scriver CR (1997) Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype–phenotype correlations. *Am J Hum Genet* **61**, 1309–1317.
- 13 Scriver CR & Waters PJ (1999) Monogenic traits are not simple. Lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* **15**, 267–272.
- 14 Okano Y, Eisensmith RC, Güttler F, Lichter-Konecki U, Konecki DS, Trefz FK, Dasovich M, Wang T, Henriksen K, Lou H *et al.* (1991) Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med* **324**, 1232–1238.
- 15 Scriver CR (1991) Phenylketonuria–genotypes and phenotype. *N Engl J Med* **324**, 1280–1281.
- 16 Svensson E, von Döbeln U, Eisensmith RC, Hagenfeldt L & Woo SL (1993) Relation between genotype and phenotype in Swedish phenylketonuria and hyperphenylalaninemia patients. *Eur J Pediatr* **152**, 132–139.
- 17 Trefz FK, Burgard P, König T, Goebel-Schreiner B, Lichter-Konecki U, Konecki D, Schmidt E, Schmidt H & Bickel H (1993) Genotype–phenotype correlations in phenylketonuria. *Clin Chim Acta* **217**, 15–21.
- 18 Fincham JRS & Pateman JA (1957) Formation of an enzyme through complementary action of mutant ‘alleles’ in separate nuclei in a heterocaryon. *Nature* **179**, 741–742.
- 19 Ponzone A, Spada M, Roasio L, Porta F, Mussa A & Ferraris S (2008) Impact of neonatal protein metabolism and nutrition on screening for phenylketonuria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **46**, 561–569.
- 20 Spaapen LJM & Rubio-Gozalbo ME (2003) Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art. *Mol Genet Metab* **78**, 93–99.
- 21 Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, Stevens RC, Thöny B & Blau N (2008) Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* **29**, 167–175.
- 22 Erlandsen H & Stevens RC (1999) The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* **68**, 103–125.
- 23 Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, François B, Michiels L, Ullrich K, Hoffmann GF, Burgard P, Schmid H *et al.* (1998) A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet* **63**, 71–79.
- 24 Pérez-Dueñas B, Vilaseca MA, Mas A, Lambruschini N, Artuch R, Gómez L, Pineda J, Gutiérrez A, Milà M & Campistol J (2004) Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. *Clin Biochem* **37**, 1083–1090.
- 25 Muntau AC, Röschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP & Rosche AA (2002) Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med* **347**, 2122–2132.
- 26 Fiege B, Bonafe L, Ballhausen D, Baumgartner M, Thony B, Meili D, Fiori L, Giovannini M & Blau N (2005) Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study. *Mol Genet Metab* **86**, S91–S95.
- 27 Pey AL, Desviat LR, Gámez A, Ugarte M & Pérez B (2003) Phenylketonuria: genotype–phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat* **21**, 70–78.
- 28 Okano Y, Asada M, Kang Y, Nishi Y, Hase Y, Oura T & Ishiki G (1998) Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients. *Hum Genet* **103**, 613–618.
- 29 Bercovich D, Elimelech A, Zlotogora J, Korem S, Yardeni T, Gal N, Goldstein N, Vilensky B, Segev R, Avraham S *et al.* (2008) Genotype–phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. *J Hum Genet* **53**, 407–418.
- 30 Song F, Qu YJ, Zhang T, Jin YW, Wang H & Zheng XY (2005) Phenylketonuria mutations in Northern China. *Mol Genet Metab* **86**, S107–S118.
- 31 Mallolas J, Vilaseca MA, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Estivill X & Milà M (1999) Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the population resident in Catalonia: genotype–phenotype correlation. *Hum Genet* **105**, 68–73.
- 32 Pey AL, Perez B, Desviat LR, Martinez A, Aguado C, Erlandsen H, Gamez A, Stevens RC, Thorolfsson M, Ugarte M *et al.* (2004) Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum Mutat* **24**, 388–399.
- 33 Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Jones AO & Scriver CR (1999) Missense mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) can cause accelerated proteolytic turnover of PAH enzyme: a mechanism underlying phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* **22**, 208–212.
- 34 Gjetting T, Petersen M, Guldberg P & Güttler F (2001) In vitro expression of 34 naturally occurring mutant variants of phenylalanine hydroxylase: correlation with metabolic phenotypes and susceptibility toward protein aggregation. *Mol Genet Metab* **72**, 132–143.
- 35 Erlandsen H & Stevens RC (2001) A structural hypothesis for BH<sub>4</sub> responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninemia and phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* **24**, 213–230.



- 36 Erlandsen H, Pey AL, Gamez A, Perez B, Desviat LR, Aguado C, Koch R, Surendran S, Tying S, Matalon R *et al.* (2004) Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 16903–16908.
- 37 Gersting SW, Kemter KF, Staudigl M, Messing DD, Danecka MK, Lagler FB, Sommerhoff CP, Roscher AA & Muntau AC (2008) Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. *Am J Hum Genet* **83**, 5–17.
- 38 Stokka AJ, Carvalho RN, Barroso JF & Flatmark T (2004) Probing the role of crystallographically defined/predicted hinge-bending regions in the substrate-induced global conformational transition and catalytic activation of human phenylalanine hydroxylase by single-site mutagenesis. *J Biol Chem* **279**, 26571–26580.
- 39 Daniele A & Di Natale P (2001) Heparan N-sulfatase: cysteine 70 plays a role in the enzyme catalysis and processing. *FEBS Lett* **505**, 445–448.
- 40 Andersen OA, Stokka AJ, Flatmark T & Hough E (2003) 2.0 Å resolution crystal structures of the ternary complexes of human phenylalanine hydroxylase catalytic domain with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine or L-norleucine: substrate specificity and molecular motions related to substrate binding. *J Mol Biol* **333**, 747–757.
- 41 Kobe B, Jennings IG, House CM, Michell BJ, Goodwill KE, Santarsiero BD, Stevens RC, Cotton RG & Kemp BE (1999) Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nat Struct Biol* **6**, 442–448.
- 42 Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T & Stevens RC (1998) Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem* **273**, 16962–16967.
- 43 Jones TA, Zou J-Y, Cowan SW & Kjeldgaard M (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* **47**, 110–119.

## **CAPITOLO 4**

**Pubblicazioni effettuate dalla Dr. Michelina Sibilio,  
durante il periodo di dottorato**

## 4.2 ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

1. Natale PD, Villani GR, Parini R, Scarpa M, Parenti G, Pontarelli G, Grosso M, Sersale G, Tomanin R, **Sibilio M**, Barone R, Fiumara A. Molecular markers for the follow-up of enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis type VI disease. *Biotechnol Appl Biochem*. 2008 Mar;49(Pt 3): 219-23
2. **Sibilio M**, Miele E, Ungaro C, Astarita L, Turco R, Di Natale P, Pontarelli G, Vecchione R, Andria G, Staiano A & Parenti G. “Chronic diarrhea in mucopolysaccharidosis IIIB”. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009 Oct;49(4):477-80.
3. Persichetti E, Chuzhanova N A, Dardis A, Tappino B, Pohl S, Thomas N S.T, Rosano C, Balducci C, Paciotti S, Dominissini S, Montalvo A L, **Sibilio M**, Parini R, Rigoldi M, Di Rocco M, Parenti G, Orlacchio A, Bembi B, Cooper D N, and Filocamo M, Beccari T. Identification and Molecular Characterization of Six Novel Mutations in the UDP-N- Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase Gamma Subunit (GNPTG) Gene in Patients with Mucopolidosis III Gamma. [Hum Mutat](#). 2009 Jun;30(6):978-84.
4. Villani GR, Grosso M, Pontarelli G, Chierchia A, Sessa R, **Sibilio M**, Parenti G, Di Natale P. Large deletion involving exon 5 of the arylsulfatase B gene caused apparent homozygosity in a mucopolysaccharidosis type VI patient. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Feb;14(1):113-20
5. Vilarinho L, Tafulo S, **Sibilio M**, Kok F, Fontana F, Diogo L, Venâncio M, Ferreira M, Nogueira C, Valongo C, Parenti G, Amorim A, Azevedo L. Identification of novel L2HGDH gene mutations and update of the pathological spectrum. *J Hum Genet*. 2010 Jan;55(1):55-8.
6. **Sibilio M**, Ungaro C, Parenti G, Andria G  
Malattia di Gaucher  
Disponibile on-line all’indirizzo: [www.ambulatorio.com](http://www.ambulatorio.com)
7. **Sibilio M**, Scala I, Andria G  
Quando sospettare una malattia metabolica  
In *Vademecum di Diagnostica e Terapia Pediatrica*. Edizione 2008. Ed. Margiacchi-Galeno pp 133-151

8. Astarita L, **Sibilio M**, Andria G. Lysosomal storage disorders: commonalities and differences. In: Lysosomal Storage Diseases: early diagnosis and new treatments. Mariani Foundation Paediatric Neurology Series: 23. Ed. Maria Mayno, 2010, pp. 3- 12

## Molecular markers for the follow-up of enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis type VI disease

Paola Di Natale<sup>\*†</sup>, Guglielmo R. D. Villani<sup>\*</sup>, Rossella Parini<sup>‡</sup>, Maurizio Scarpa<sup>‡</sup>, Giancarlo Parenti<sup>§</sup>, Gianfranco Pontarelli<sup>\*</sup>, Michela Grosso<sup>\*</sup>, Giovanna Sersale<sup>‡</sup>, Rosella Tomanin<sup>‡</sup>, Michelina Sibilio<sup>§</sup>, Rita Barone<sup>||</sup> and Agata Fiumara<sup>||</sup>

<sup>\*</sup>Department of Biochemistry and Medical Biotechnologies, University of Naples Federico II, Naples, Italy, <sup>†</sup>Department of Pediatrics, University of Milan and San Gerardo Hospital, Monza, Milano, Italy, <sup>‡</sup>Department of Pediatrics, University of Padua, Padua, Italy, <sup>§</sup>Department of Pediatrics, University of Naples Federico II, Naples, Italy, and <sup>||</sup>Department of Pediatrics, University of Catania, Catania, Sicily, Italy

**MPS VI (mucopolysaccharidosis type VI) is a lysosomal storage disease in which deficient activity of the enzyme *N*-acetylgalactosamine 4-sulfatase [ASB (arylsulfatase B)] impairs the stepwise degradation of the GAG (glycosaminoglycan) dermatan sulfate. Clinical studies of ERT (enzyme replacement therapy) by using rhASB (recombinant human ASB) have been reported with promising results. The release of GAG into the urine is currently used as a biomarker of disease, reflecting in some cases disease severity and in all cases therapeutic responsiveness. Using RNA studies in four Italian patients undergoing ERT, we observed that TNF $\alpha$  (tumour necrosis factor  $\alpha$ ) might be a biomarker for MPS VI responsive to therapy. In addition to its role as a potential biomarker, TNF $\alpha$  expression could provide insights into the possible pathophysiological mechanisms underlying the mucopolysaccharidoses.**

### Introduction

MPS VI [mucopolysaccharidosis type VI; Maroteaux–Lamy syndrome; McKusick MIM (Mendelian Inheritance in Man) no. 253200] is an autosomal recessive disease resulting from mutations in the *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase [ASB (arylsulfatase B)] gene, which results in turn in a lack of active enzyme. In the absence of ASB, the stepwise degradation of the GAG (glycosaminoglycan) dermatan sulfate is blocked, causing a chronic progressive disorder. The estimated rate of incidence of MPS VI ranges from 1:100 000 to 1:1 300 000 in various populations [1]. MPS VI patients can present with a spectrum of clinical phenotypes: severely affected patients suffer early onset of the disease, with rapid progression and death occurring in the early teens, whereas patients at the attenuated end of the clinical spectrum have a later onset and variable presentation, with a lifespan of up to 50 years or more. Clinical features can include growth retardation, coarse facial features, stiff joints, skeletal malformations, respiratory difficulties, corneal

clouding, hepatosplenomegaly and cardiac abnormalities. ERT (enzyme-replacement therapy) involving the infusion of a human recombinant enzyme was started recently, with promising results [2–4]. Moreover, for several MPS VI patients undergoing this therapy, mutational analysis showed that the genotype–phenotype correlation might be predictive of ERT efficacy [5,6].

Currently, there are no objective biomarkers of MPS disease besides GAG that clearly reflect disease severity or therapeutic responsiveness. Some targets and biomarkers have been identified at the protein level for MPS VI and VII animal models. Among these, several molecules such as NO (nitric oxide), pro-inflammatory cytokines, MMPs (matrix metalloproteinases) and TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) were suggested as easily measurable potential biomarkers in animal synovial fluid and/or serum, thus representing a more direct measure of the changes in the joints and bone than the currently used GAG release into the urine [7]. More recently, the HCII–T complex (heparin cofactor II–thrombin complex concentration in the serum of MPS I patients was reported to be a good biomarker with which to follow up therapy [8].

In the present paper, using real-time RT–PCR (reverse transcription–PCR) analysis of RNA samples prepared from blood of MPS VI patients undergoing ERT, we have explored several molecules as potential biomarkers for

**Key words:** biomarker, enzyme-replacement therapy (ERT), glycosaminoglycan (GAG), heparin cofactor II, (HCII), mucopolysaccharidosis type VI (MPS VI), tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).  
**Abbreviations used:** ASB, arylsulfatase B (*N*-acetylgalactosamine-4-sulphatase); CCL3, CC chemokine ligand 3; ERT, enzyme-replacement therapy; GAG, glycosaminoglycan; HCII, heparin cofactor II (HCII is also known as SERPINC1 [serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1]); HCII–T complex, HCII–thrombin complex; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; MMP, matrix metalloproteinase; MPS VI, mucopolysaccharidosis type VI; rhASB, recombinant human ASB; RT–PCR, reverse transcription–PCR; SPARC, secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin); TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases-1; TNF $\alpha$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ .

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed (email [pdinatale@unina.it](mailto:pdinatale@unina.it)).



Table 1 Effect of therapy on the four MPS VI Italian patients subjected to ERT

Patient no.	Age (years) <sup>a</sup>	Mutations identified <sup>b</sup>	Effect of therapy after 6 months	
			GAG excretion <sup>c</sup>	The 6-min walk test <sup>d</sup>
1	5	L82R and R315Q	27	134
2	5	R315X and c1475delC	22	313
3	6	H242P and c1213+6T>C	29	340
4	4	R315X and R315X	58	530

<sup>a</sup> Age at the start of ERT.<sup>b</sup> Protein sequence and nucleotide alterations numbered according to Peters et al. [10], GenBank® accession number J05225.1.<sup>c</sup> GAG excretion is reported in terms of relative reduction in excretion and is expressed as a percentage of the baseline excretion.<sup>d</sup> The 6-min walk test is reported in terms of distance walked (metres).

the response to therapy. The pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$  (tumour necrosis factor  $\alpha$ ) appears to be a possible candidate.

## Materials and methods

### Patients

The four patients reported in the present study (patients 1–4) were clinically classified as affected by the severe form of the MPS VI disease. Patients 1 and 2 were treated in Monza, patient 3 was treated in Padua and patient 4 was treated in Naples (Table 1). The patients received weekly infusions of Naglazyme (galsulfase; a commercial ASB used for ERT purposes that is marketed by BioMarin Pharmaceutical Co., Novato, CA, U.S.A.) at the dose of 1 mg/kg. GAG in the urine samples was determined with the DMB (dimethyl-methylene Blue) test [9] and the GAG concentration was normalized to urinary creatinine concentrations. The 6 min walk followed standard guidelines.

### Mutational analysis of the ASB gene

DNA was isolated from blood of the four patients. Exons 1–8, including the exon/intron boundaries of the ASB gene, were amplified by PCR under previously described conditions [10,11]. Purified PCR-amplified exons were directly sequenced.

### Isolation of RNA

Blood samples from patients and age-matched normal controls were collected in the PAXgene RNA tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.) and allowed to equilibrate for 24 h; on the day after collection, total RNA was isolated by using the PAXgene RNA kit (Qiagen Italia, Milan, Italy) following the manufacturer's protocol. The concentration and purity of the RNA preparations were determined by measuring the absorbance spectrophotometrically at 260, 280 and 230 nm; the quality of the samples was verified by standard gel electrophoresis.

### Real-time RT-PCR

The cDNA was synthesized by using 1  $\mu$ g of total RNA in the presence of random primers, dNTPs, RNase inhibitor and reverse transcriptase (all from Promega, Madison, WI, U.S.A.) following the manufacturer's protocol. The PCR was performed in a 25  $\mu$ l reaction solution containing 12.5  $\mu$ l of RT<sup>2</sup> Real-time SYBR Green/Fluorescein PCR Master Mix (from SuperArray Bioscience Corp., Frederick, MD, U.S.A.), 1.0  $\mu$ l of template cDNA and 0.2  $\mu$ M PCR primer set. The PCR conditions were as follows: 95 °C for 15 min, 40 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 5 min. The relative expression of mRNA for the target genes was performed by the comparative  $C_t$  (threshold cycle),  $\Delta\Delta C_t$  method, by using the  $\beta$ -microglobulin gene as the control [12]. A validation experiment was performed for each gene of interest and its control to determine the conditions for the optimal concentration of primers and templates. The normalized  $C_t$  was obtained by subtraction of the  $C_t$  value for  $\beta$ -microglobulin from the  $C_t$  value for the gene of interest ( $\Delta C_t$ ). The difference between the  $\Delta C_t$  values for patient and control samples gave the  $\Delta\Delta C_t$  value, which was then used for the calculation of the relative mRNA expression using the formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . The relative mRNA levels were expressed as fold change in patients over normal controls. The following primer pairs were used for each gene of interest:  $\beta$ -microglobulin: forward primer, ccgtggccttagctgtgct, and reverse primer, tcggatggatgaaaccaga; CCL3 (CC chemokine ligand 3): forward primer, ccacattccgtcacctgct, and reverse primer, atctgccgggaggtgtagct; TIMP-1: forward primer, agttttgtg-gtccctcgaa, and reverse primer, ggctccgccacaagcaatg; TNF $\alpha$ : forward primer, cgctcttctgcctgctgc, and reverse primer, ggggttgctacaacatgggg; MMP9 (matrix metalloproteinase 9; gelatinase B, 92 kDa gelatinase, 92 kDa type IV collagenase): forward primer, ggtggaccggatgttccc, and reverse primer, ataggtcacgtagccacttgg; SPARC [secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)]: forward primer, ttgtc-cacaaagtgcaccc, and reverse primer, ccaggacgttcttgagccag; HCII: forward primer, aagctcaccaaggcctcat, and reverse



primer, tctcattcagccggaagtgt; IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ): forward primer, ctgcagtgaaatgatggct, and reverse primer, gtcgagattcgtagctggat. All the primers were designed by Primer Express software (Applied Biosystems). For each primer set, the efficiency was evaluated [12] by using 10-fold serially diluted cDNAs for each amplicon and the slope values given by the instrument were used in the following equation:

$$\text{Efficiency} = (10^{1/\text{slope}}) - 1$$

All primer sets had an efficiency of  $100 \pm 10\%$ .

## Results

We studied a group of four Italian MPS VI patients undergoing ERT to seek biomarkers of the therapy. The injection of rhASB (recombinant human ASB) was performed as described in the Materials and methods section. The patients' ages at the time of treatment ranged from 4 to 6 years. The patients were also characterized at the molecular level (Table 1). In total, six different mutations that potentially caused the pathology were identified. Patient 1 had a missense mutation, R315Q, which has been previously described [11], associated with the novel alteration L82R. Patient 2 was heterozygous for the previously reported R315X mutation [13] and for the novel mutation c1475delC, both expected to produce a non-functional protein; the nonsense mutation R315X causes the production of a polypeptide lacking one-third of the amino acids compared with the wild-type protein, and the deletion of nt 1475 leads to a frameshift in exon 8 of the gene. Patient 3 was heterozygous for mutation H242P and the intron mutation c1213+6T>C, neither previously described. The intronic mutation affecting the 5' donor splice site of intron 6 would be expected to produce a non-functional protein, owing to incorrect splicing. Patient 4 was homozygous for mutation R315X.

The effect of the treatment was evaluated by the quantitative measurements of urinary GAG and by the 6-min walk test. Urinary GAG excretion measured at 6 months from the start of the therapy showed a mean relative reduction to 34% of the baseline (Table 1), a value similar to those previously reported [2–4]. The 6-min walk test (Table 1) gave values indicating the validity of the therapy for patients 3 and 4: the walk distances for them were 340 and 530 m compared with the baseline values of 180 and 240 m respectively. For patient 1, no baseline value was available. Only for patient 2 the distance walked in 6 min was unchanged after therapy with respect to the baseline value.

Real-time RT-PCR analysis was performed on transcripts obtained from the patients' blood in order to study the expression profile of potential candidate genes to be used as biomarkers in the follow-up of the ERT. Table 2 summarizes

Table 2 Fold change, compared with the normal control, of the expression of various genes, measured in patient 1 at different months from the first injection

Gene	Time (months)	Fold change				
		0	1	2	3	8
SPARC		0.39	0.33	0.23	0.23	0.22
MMP9		0.61	0.32	0.33	0.18	0.23
TIMP-1		0.42	0.10	0.14	0.16	0.20
IL-1 $\beta$		0.06	0.35	0.20	0.40	0.31
HCL		0.53	0.45	0.57	0.47	0.84
CCL3		0.43	0.55	0.43	0.97	0.50
TNF $\alpha$		2.29	0.39	0.25	0.29	0.29

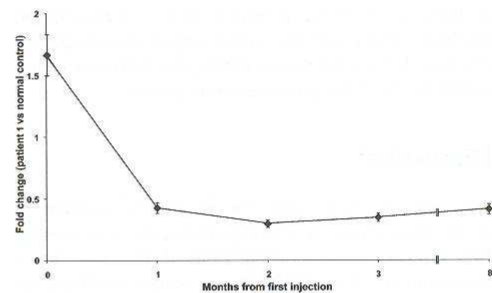


Figure 1 TNF $\alpha$  molecular expression in patient 1 at several treatment points

the results obtained in patient 1 using this analysis as an initial screening. Among the seven genes examined from 1 to 8 months from the first treatment, only TNF $\alpha$  was up-regulated before therapy, presenting a 2.29-fold increase in its expression compared with the normal control (Table 2): after the first treatment with rhASB, the TNF $\alpha$  transcript in this patient decreased to below the normal levels (0.39-fold compared with the control), with decreased values up to 8 months from the start of therapy. All the other genes tested (coding for SPARC, MMP9, TIMP-1, IL-1 $\beta$ , HCL and CCL3) proved to be down-regulated before therapy, with values below the normal controls persisting up to 8 months from the start of the injections with rhASB (Table 2). Taking into account the results obtained from this initial screening, the analysis of the TNF $\alpha$  gene in patient 1 was repeated three times more to verify the statistical relevance of the data concerning this gene; the results are given in Figure 1. As shown, TNF $\alpha$  was again found to be elevated before the treatment, with a mean fold change of  $1.66 \pm 0.21$ ; it showed a decrease as early as 1 month from the start of treatment ( $0.42 \pm 0.13$ -fold change), maintaining similar values until 8 months from the start of the therapy ( $0.41 \pm 0.16$ -fold change). The TNF $\alpha$  expression was also evaluated in the other three MPS VI patients undergoing ERT and the values

Table 3 Fold change, compared with the normal control, of TNF $\alpha$  expression at different times after the first injection

		Fold change							
Patient no.	Time (months)	0	1	2	3	4	5	6	7
2		n.a.	0.31	0.32	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.53
3		n.a.	0.31	0.52	0.46	0.46	n.a.	n.a.	n.a.
4		n.a.	0.40	0.46	0.5	n.a.	0.35	n.a.	0.23

recorded are shown in Table 3. Although no samples prior to treatment were available for these three patients, all showed TNF $\alpha$  transcript levels after therapy substantially the same as those obtained for patient 1, with a 0.23–0.53-fold change compared with the normal subject, thus supporting the data obtained for this patient for the depressive effects of ERT on the TNF $\alpha$  gene expression profile.

## Discussion

Very few analytical tools are at present available to predict disease severity and responsiveness to therapies for MPS diseases. It is generally believed that the clinical phenotype variation of MPS VI may be due to differences and combinations of ASB gene mutations, leading to variable amounts of residual ASB activity [14]. In the present study, the mutational analysis for patients 2, 3 and 4 showed several defects (Table 1) likely to result in non-functional ASB protein and cause severe clinical phenotypes if left untreated. The R315Q mutation identified for patient 1 was previously reported to be associated with an intermediate phenotype [11] and was also shown to produce, among several mutations expressed *in vitro*, the highest level of ASB protein and activity [5]; however, for patient 1, the clinical phenotype was classified as severe, probably due to the effect of the novel mutation L82R. Our studies confirm that the mutational analysis and early intervention with ERT were advantageous for these four patients, all affected by the severe form of the disease, for which ERT is likely to be more beneficial.

Urinary GAG quantification is the most widely used method for testing the response to treatments [2–4] and has proved helpful in some cases to distinguish the disease phenotypes [15]. Other, more specific biomarkers useful to predict disease severity and responsiveness to therapies are very much needed. In this regard, a recent report on MPS I demonstrated a significant decrease in HCII in patient serum and a significant increase in HCII–T complex formation, changes that correlated with the clinical measures of disease severity as well as responsiveness to ERT [8].

In the present study we analysed several genes as potential biomarkers for MPS VI disease, ranging from

molecules such as IL-1, MMP9, TIMP-1 and TNF $\alpha$ , which were previously indicated as potential biomarkers for animal models [7], to SPARC, which is involved in tissue remodelling and could be a potential marker for bone and cartilage, to HCII, reported for MPS I [8], and CCL3, reported for MPS IIIB [16]. Interestingly, HCII, demonstrated to be low at the protein level in MPS I patients, was also low at the RNA level for our MPS VI subjects (Table 2).

A limitation of our study is the low number of patients undergoing ERT; moreover, only for one patient was it possible to measure the baseline levels of the genes of interest. The results obtained by real-time RT–PCR analysis in patient 1 showed that, before treatment, only TNF $\alpha$  was elevated compared with the normal control. Cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  are produced by MPS chondrocytes, synoviocytes and macrophages. Since striking osseous changes are the main clinical characteristics of the Maroteaux–Lamy syndrome and since a linear correlation was reported between TNF $\alpha$  concentrations and the severity of chondral damage in several degenerative joint diseases [17], the elevation of the chondrodestructive TNF $\alpha$  cytokine level in patient 1 compared with the normal control is not surprising. TNF $\alpha$  expression, followed at several time points from the first injection of the recombinant enzyme, showed a decrease, suggesting a response to therapy. TNF $\alpha$ , a potential biomarker of the disease, needs to be confirmed in larger studies on MPS VI patients to define more accurately its implication in disease and responsiveness to therapy.

In summary, we have shown that TNF $\alpha$  in MPS VI patients appears to be a potential biomarker of the disease. Although the results on TNF $\alpha$  reported here relate specifically to MPS VI, they may be relevant to other forms of MPS.

## Acknowledgments

We thank the MIUR (Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca Scientifica), Rome, Italy, the Associazione Italiana Mucopolisaccaridosi (Milan, Italy) and the AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco), Rome, Italy, for financial support.

## References

- Neufeld, E. F. and Muenzer, J. (2001) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D., eds), pp. 3421–3452. McGraw-Hill, New York.
- Harmatz, P., Whitley, C. B., Waber, L., Pais, R., Steiner, R., Plecko, B., Kaplan, P., Simon, J., Butensky, E. and Hopwood, J. J. (2004) *J. Pediatr.* **144**, 574–580.



- 3 Harmatz, P., Ketteridge, D., Giugliani, R., Guffon, N., Teles, E. L., Miranda, M. C., Yu, Z. F., Swiedler, S. J. and Hopwood, J. J. (2005) *Pediatrics* **115**, 681–689
- 4 Harmatz, P., Giugliani, R., Schwartz, I., Guffon, N., Teles, E. L., Miranda, M. C., Wraith, J. E., Beck, M., Arash, L., Scarpa, M. et al. (2006) *J. Pediatr.* **148**, 533–539
- 5 Karageorgos, L., Harmatz, P., Simon, J., Pollard, A., Clements, P. R., Brooks, D. A. and Hopwood, J. J. (2004) *Hum. Mutat.* **23**, 229–233
- 6 Karageorgos, L., Brooks, D. A., Harmatz, P., Ketteridge, D., Pollard, A., Melville, E. L., Parkinson-Lawrence, E., Clements, P. R. and Hopwood, J. J. (2007) *Mol. Genet. Metab.* **90**, 164–170
- 7 Simonaro, C. M., D'Angelo, M., Haskins, M. E. and Schuchman, E. H. (2005) *Pediatr. Res.* **57**, 701–707
- 8 Randall, D. R., Sinclair, G. B., Colobong, K. E., Hetty, E. and Clarke, L. A. (2006) *Mol. Genet. Metab.* **88**, 235–243
- 9 Whitley, C. B., Ridnour, M. D., Draper, K. A., Dutton, C. M. and Neglia, J. P. (1989) *Clin. Chem.* **35**, 374–379
- 10 Peters, C., Schmidt, B., Rommerskirch, W., Rupp, K., Zuhlsdorf, M., Vingron, M., Meyer, H. E., Pohlmann, R. and von Figura, K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3374–3381
- 11 Villani, G. R. D., Balzano, N., Vitale, D., Saviano, M., Pavone, D. and Di Natale, P. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1453**, 185–192
- 12 Orlando, C., Pinzani, P. and Pazzagli, M. (1998) *Clin. Chem. Lab. Med.* **36**, 255–269
- 13 Voskoboeva, E. Y., Krasnopol'skaya, X. D., Peters, C. and von Figura, K. (2000) *Russ. J. Genet.* **36**, 689–694
- 14 Litjens, T. and Hopwood, J. J. (2001) *Hum. Mutat.* **18**, 282–295
- 15 Swiedler, S. J., Beck, M., Bajbouj, M., Giugliani, R., Schwartz, I., Harmatz, P., Wraith, J. E., Roberts, J., Ketteridge, D., Hopwood, J. J. et al. (2005) *Am. J. Med. Genet. A* **134**, 144–150
- 16 Villani, G. R. D., Gargiulo, N., Faraonio, R., Castaldo, S., Gonzalez y Reyero, E. and Di Natale, P. (2007) *J. Neurosci. Res.* **85**, 612–622
- 17 Verbruggen, G. (2006) *Rheumatology* **45**, 129–138

Received 25 April 2007/13 July 2007; accepted 3 August 2007

Published as Immediate Publication 3 August 2007, doi:10.1042/BA20070093

## Case Report

# Chronic Diarrhea in Mucopolysaccharidosis IIIB

\*Micheline Sibilio, \*Erasmo Miele, \*Carla Ungaro, \*Luca Astarita, \*Rossella Turco,  
†Paola Di Natale, †Gianfranco Pontarelli, ‡Raffaella Vecchione, \*Generoso Andria,  
\*Annamaria Staiano, and \*Giancarlo Parenti

\*Department of Pediatrics, †Department of Biochemistry and Medical Biotechnologies, and

‡Department of Pathology, Federico II University, Naples, Italy

Mucopolysaccharidosis (MPS) IIIB (Sanfilippo syndrome, OMIM 252920) is a lysosomal storage disorder caused by the deficiency of  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase (NAGLU), a lysosomal hydrolase involved in the degradation of heparan sulphate (HS) (1). MPS IIIB is characterized by multisystem involvement and a complex phenotype. The most debilitating manifestations of the disease are those related to central nervous system disease, with severe and progressive mental retardation, hyperactivity, and behavioral problems. Skeletal and visceral manifestations are less prominent, as compared with other MPS.

Gastrointestinal manifestations, including diarrhea and constipation, have occasionally been described in patients with MPS IIIB, but they have been poorly characterized and their pathophysiology is not known.

Although gastrointestinal symptoms are often overshadowed by the severe neurological phenotype, they may affect the quality of life of patients and of their families.

We describe a case of MPS IIIB, referred to our hospital because of chronic diarrhea, in which abnormalities of intestinal endoscopy, histology, and scintigraphy with Tc-99m-labeled human serum albumin were found, partially overlapping with the features of intestinal lymphangiectasia. In this patient, a low-fat diet and supplementation of medium-chain triglycerides were started, leading to persisting improvement of diarrhea. These results add information on the pathophysiology of intestinal manifestations in MPS IIIB patients and possibly in other MPS patients with a history of chronic diarrhea.

## CASE REPORT

We describe a case of MPS IIIB, an 11-year-old Italian boy, born to healthy consanguineous parents, referred to our hospital at the age of 9 years because of developmental delay and severe chronic diarrhea. Besides parental consanguinity, family history was noncontributory. The first years of life were uneventful. Developmental delay was initially noticed at the age of 3 years. Gastrointestinal manifestations started at the age of 8 years.

At the time of admission to our hospital his parents reported that the boy had 14 to 15 movements per day of semiformal to watery large-volume stools, often associated with abdominal pain. The parents also reported that because the boy was not continent, frequent emission of large amounts of stools caused significant discomfort to them and to other attendants, both at home and at school. The patient was unsuccessfully treated with oral antibiotics and cholestyramine. On physical examination height was 137 cm (90th–95th percentile), weight 36.1 kg (90th–95th percentile), and body mass index 19.2 kg/m<sup>2</sup>. Facial coarsening, macrocephaly, confluence of eyebrows, hirsutism, and hepatosplenomegaly were present. The patient had severe developmental delay and hyperactivity; he was not able to collaborate in an IQ test.

On the basis of the clinical history and presentation, the diagnosis of MPS IIIB was suspected. Urine glycosaminoglycan (GAG) excretion was increased: 40 mg/g GAG creatinine (normal value for age: 22 ± 13). Serum NAGLU deficiency was demonstrated and the molecular analysis of the NAGLU gene showed compound heterozygosity for the P115S and IVS3 + 1G > A mutations. A diagnostic work-up to investigate possible associated causes of diarrhea was started. His hemogram showed hemoglobin values of 12.1 g/dL, and a white blood cell count of  $4.60 \times 10^3/\mu\text{L}$  without lymphocytopenia ( $2.57 \times 10^3/\mu\text{L}$ ). Peripheral CD4 and CD8 cell counts were normal.

Received November 27, 2007; accepted August 8, 2008.

Address correspondence and reprint requests to Prof Giancarlo Parenti, Department of Pediatrics, Federico II University, via Sergio Pansini 5, 80131 Naples, Italy (e-mail: parenti@unina.it).

The authors report no conflicts of interest.



Routine laboratory analyses were normal with erythrocyte sedimentation rate of 2 mm in the first hour, total serum protein 6.7 g/dL (normal range 6.0–8.0 g/dL) and serum albumin 4.3 g/dL (normal range: 3.7–5.5 g/dL),  $\text{Na}^+$  139 mmol/L,  $\text{K}^+$  4.4 mmol/L, Ca tot 9.7 mg/dL, serum iron 93 mg/dL and ferritin 53 ng/mL, and normal serum protein electrophoresis. Liver function, renal function, urinalysis, and kidney ultrasonography were also normal. Immunoglobulin (Ig) G was slightly reduced (6.63; normal range for age: 6.73–17.34 g/L). Serological markers for celiac disease (antitissue trans-glutaminase, antiendomysial and antigliadin IgG and IgA) were negative. Serologic markers for inflammatory bowel disease, including anti-*Saccharomyces cerevisiae* IgG and IgA and anti-neutrophil cytoplasmic IgG, were negative. Fecal calprotectin concentration was within the normal range. Neither fecal occult blood loss nor steatorrhea was detected.

Common gastrointestinal infections were excluded by repeated stool cultures and search for parasites. Fecal adenovirus and rotavirus antigens were also negative. Infection by *Helicobacter pylori* was excluded through invasive (histological examination) and noninvasive (serology and stool antigen assay) diagnostic tests. Stool testing for *Clostridium difficile* toxins A/B was negative. Lactose intolerance was excluded by a negative breath hydrogen test. Mucosal damage was excluded by cellobiose or mannitol tests (repeated on 2 different occasions), suggesting normal intestinal permeability. Possible enteric protein losses were investigated by fecal  $\alpha_1$ -antitrypsin, showing normal results (0.07 mg/g wet feces; normal  $< 0.44 \pm 0.06$  mg/g wet feces).

Ultrasound examination of the heart showed only the typical findings of MPS (thickening of mitral and aortic valves and aortic valve regurgitation) without significant hemodynamic consequences. An abdominal computed tomography was normal, with exception of moderate hepatosplenomegaly.

Upper gastrointestinal tract endoscopy revealed scattered white spots in the proximal duodenum (Fig. 1); histological examination of ileum showed dilated lymphatic vessels in the lamina propria, without evidence of inflammation (Fig. 2). Colonoscopy revealed no apparent abnormalities.

An abdominal scintigraphy with Tc-99m-labeled human serum albumin was performed, showing radioactivity in duodenum, proximal jejunum, and ileocecal valve (Fig. 3).

The histologic and endoscopic features, together with the findings of the scintigraphy, overlapped with those of intestinal lymphangiectasia (IL). Therefore, we decided to start a therapeutic trial with a low-fat diet supplemented with medium-chain triglyceride (MCT)-based formula (Portagen, Mead Johnson, Nijmegen, the Netherlands) (2,3). After 2 months on this treatment, the patient showed signs of a favorable response and diarrhea gradu-



FIG. 1. Endoscopic examination revealed diffusely scattered white spots throughout the mucosa of the proximal duodenum.

ally improved (1–3 times/day). He remained stable for the following months.

Two years after the start of treatment with MCT-rich diet, the patient's growth is still normal. His height is 152 cm (75th–90th percentile), his weight is 45 kg (75th–90th percentile), and his body mass index is 19.3 kg/m<sup>2</sup>. Laboratory tests show normal serum protein, albumin, and calcium levels; a mild decreased levels of IgG persists (6.23–normal range for age: 8.21–18.35); fecal clearance of  $\alpha_1$ -antitrypsin is also normal (0.01 mg/g wet feces).

Compliance with a low-fat diet is reported as good. The improvement and the stabilization of gastrointestinal manifestation are judged by the parents as a substantial improvement of the patient's quality of life.

## DISCUSSION

We report on a case of a patient affected by MPS IIIB with chronic and intractable diarrhea. Because of its severity (elevated stools' frequency) and its chronic course, diarrhea had a strong impact on the patient's quality of life and overall health. Chronic diarrhea has occasionally been observed in MPS IIIB, but there are no reports in the literature on the characterization of intestinal manifestations in these patients. Thus, this is the first description of intestinal findings in an MPS IIIB patient.

In our patient a diagnostic work-up to investigate causes of chronic diarrhea resulted in findings that partially overlapped with those observed in IL. IL is

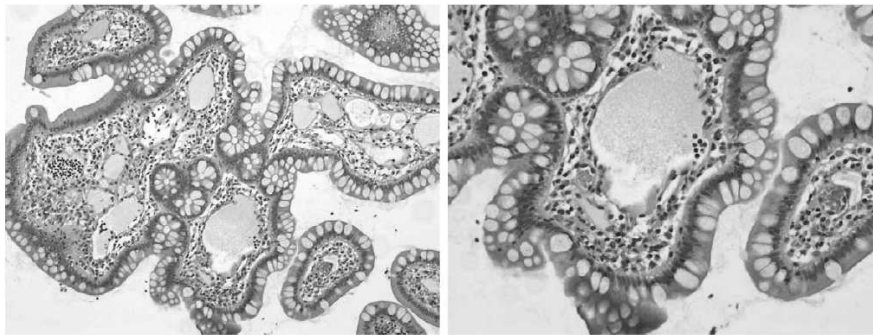


FIG. 2. Histological examination of ileum mucosa showing dilatation of the lymphatic vessels in the lamina propria.

an uncommon condition, characterized by dilated intestinal submucosal and subserosal lymphatics (4). Protein-losing enteropathy, resulting from blocked intestinal lymphatics and loss of lymphatic fluid within the gastrointestinal tract, is the most common manifestation of this disease. IL can be primary or associated with different conditions (secondary or syndromic). Typical features of the disease, presenting with variable severity, include general or peripheral edema, diarrhea, chylous ascites, chylous pleural effusion, and blindness due to macular edema (4).

The findings observed in our patient, particularly the appearance of the intestinal mucosa at endoscopy,

histology, showing dilated lymphatics and scintigraphy, were puzzling, as they were not associated with the typical clinical (eg, growth retardation, edema) and biochemical manifestations of IL (protein loss). However, Van der Meer et al (5) reported a case of a girl with IL without physical signs and laboratory evidence of enteric protein loss; also in this case, such as in our patient, the diagnosis of IL was made basis on the endoscopic and histological manifestations.

Investigations to detect other conditions causing intractable and chronic diarrhea were negative. Causes of secondary IL (abdominal tumors, recurrent parasitic infection, hepatic cirrhosis, chronic pancreatitis, Crohn disease, Whipple disease, radiotherapy, constrictive pericarditis, and other cardiac conditions) were also excluded by a negative clinical history or by the results of specific investigations.

Despite the absence of a complete clinical picture of IL, we started a treatment on the basis of low-fat normocaloric diet, enriched with MCT (2,3). This dietary regimen was effective in reducing stool frequency (1–3 per day). The positive clinical response to MCT-based formula is difficult to explain. It may be speculated that the early start of a dietary treatment in our patient has been able to prevent the full expression of protein-losing enteropathy, including the biochemical profile characterized by hypoproteinemia, hypoalbuminemia, lymphocytopenia, hypogammaglobulinemia, and hypocalcemia.

The abnormalities of intestinal endoscopy, histology, and scintigraphy with Tc-99m-labeled human serum albumin, reported in IL, remain unexplained in our patient. This association may be casual. However, gastrointestinal findings with recurrent and occasionally severe diarrhea are described in MPSs, including MPS II and MPS IIIB (1). The pathogenesis of gastrointestinal involvement in MPSs is obscure.

Węgrzyn et al (6), suggested a possible role of microbial infections of digestive tract in an MPS I patient.

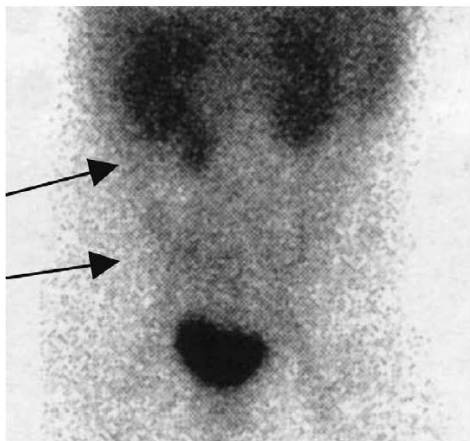


FIG. 3. Tc-99m-human serum albumin scintigraphy showing abnormal uptake of tracer material (arrows) in duodenum, proximal jejunum and ileocecal valve.



In our patient, we did not find evidence of bacterial, viral, and fungal infection, although we cannot exclude an infection by uncommon or atypical pathogens.

Alternatively, a localized GAG storage may cause a mechanical obstruction of intestinal lymphatics that may lead to fluid loss and diarrhea. This is consistent with the finding in our patient of dilated lymphatic vessels in the ileal lamina propria and abnormal pattern on scintigraphy with Tc-99m-labeled human serum albumin.

A possible role of HS, the substrate accumulated in MPS IIIB, in the occurrence of gastrointestinal manifestations may also be considered. HS is not only an important component of the extracellular matrix and cell surface but it is also associated with important cell functions (cell motility, interaction between the intra- and extracellular matrices) and with regulation of extracellular signalling pathways (eg, by modulating fibroblast growth factor cytokine activity). In addition, a role of HS proteoglycan has been recognized in protein-losing enteropathy, with correlations with protein leakage and modulation of cytokines, although the molecular mechanisms that mediate this effect are unknown (7,8).

In conclusion, we suggest that MPS patients presenting with diarrhea should be investigated carefully to detect the signs, such as those found in our patient, with particular attention to histological findings of dilated intestinal lymphatics. A treatment with MCT-based

formula may be considered to alleviate the clinical course of MPS disorders. A careful characterization of gastrointestinal manifestations may also add further information on the role of GAGs levels and localization in the function of intestine.

## REFERENCES

1. Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds; *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol 4. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001:3421–52.
2. Alfano V, Tritto G, Alfonsi L, et al. Stable reversal of pathologic signs of primitive intestinal lymphangiectasia with a hypolipidic, MCT-enriched diet. *Nutrition* 2000;16:303–4.
3. Tift WL, Lloyd JK. Intestinal lymphangiectasia. Long-term results with MCT diet. *Arch Dis Child* 1975;50:269–76.
4. Vardy PA, Lebenthal E, Shwachman H. Intestinal lymphangiectasia: a reappraisal. *Pediatrics* 1975;55:842–51.
5. Van der Meer SB, Forget PP, Willebrand D. Intestinal lymphangiectasia without protein loss in a child with abdominal pain. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;10:246–8.
6. Węgrzyn G, Kurlenda J, Liberek A, et al. Atypical microbial infections of digestive tract may contribute to diarrhea in mucopolysaccharidosis patients: a MPS I case study. *BMC Pediatr* 2005;5:9.
7. Murch SH, Winyard PJ, Koletzko S, et al. Congenital enterocyte heparan sulphate deficiency with massive albumin loss, secretory diarrhoea, and malnutrition. *Lancet* 1996;347:1299–301.
8. Bode L, Murch S, Freeze HH. Heparan sulfate plays a central role in a dynamic in vitro model of protein-losing enteropathy. *J Biol Chem* 2006;281:7809–15.

# Identification and Molecular Characterization of Six Novel Mutations in the UDP-N-Acetylglucosamine-1-Phosphotransferase Gamma Subunit (*GNPTG*) Gene in Patients with Mucopolidosis III Gamma

Emanuele Persichetti,<sup>1</sup> Nadia A. Chuzhanova,<sup>2</sup> Andrea Dardis,<sup>3</sup> Barbara Tappino,<sup>4</sup> Sandra Pohl,<sup>5</sup> Nick S.T. Thomas,<sup>6</sup> Camillo Rosano,<sup>7</sup> Chiara Balducci,<sup>1</sup> Silvia Paciotti,<sup>1</sup> Silvia Dominissini,<sup>3</sup> Anna Lisa Montalvo,<sup>3</sup> Michela Sibilio,<sup>8</sup> Rossella Parini,<sup>9</sup> Miriam Rigoldi,<sup>9</sup> Maja Di Rocco,<sup>10</sup> Giancarlo Parenti,<sup>8,11</sup> Aldo Orlacchio,<sup>12</sup> Bruno Bembì,<sup>3,13</sup> David N. Cooper,<sup>6</sup> and Mirella Filocamo,<sup>4\*</sup> Tommaso Beccari<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy; <sup>2</sup>School of Computing, Engineering and Physical Sciences, University of Central Lancashire, Preston, United Kingdom; <sup>3</sup>Unità di Malattie Metaboliche, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) Burlo Garofolo, Trieste, Italy; <sup>4</sup>Laboratorio Diagnosi Pre-Postnatale Malattie Metaboliche, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) G. Gaslini, Genova, Italy; <sup>5</sup>Department of Biochemistry, Children's Hospital, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; <sup>6</sup>Institute of Medical Genetics, Cardiff University, Cardiff, United Kingdom; <sup>7</sup>Bioinformatica, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italy; <sup>8</sup>Dipartimento di Pediatria, Università Federico II, Napoli, Italy; <sup>9</sup>Clinica Pediatrica, Ospedale S. Gerardo, Monza, Italy; <sup>10</sup>Unità Operativa Pediatria II, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) G. Gaslini, Genova, Italy; <sup>11</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine, Napoli, Italy; <sup>12</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy; <sup>13</sup>Centro di Coordinamento Regionale Malattie Rare, Azienda Ospedaliera Universitaria "Santa Maria della Misericordia", Udine, Italy

Communicated by Michel Goossens

Received 22 June 2008; accepted revised manuscript 25 November 2008.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/humu.20959

**ABSTRACT:** Mucopolidosis type III (MLIII) is an autosomal recessive disorder affecting lysosomal hydrolase trafficking. In a study of 10 patients from seven families with a clinical phenotype and enzymatic diagnosis of MLIII, six novel *GNPTG* gene mutations were identified. These included missense (p.T286M) and nonsense (p.W111X) mutations and a transition in the obligate AG-dinucleotide of the intron 8 acceptor splice site (c.610-2A>G). Three microdeletions were also identified, two of which (c.611delG and c.640-667del28) were located within the coding region whereas one (c.609+28\_610-16del) was located entirely within intron 8. RT-PCR analysis of the c.610-2A>G transition demonstrated that the change altered splicing, leading to the production of two distinct aberrantly spliced forms, viz. the skipping of exon 9 (p.G204\_K247del) or the retention of introns 8 and 9 (p.G204VfsX28). RT-PCR analysis, performed on a patient homozygous for the intronic deletion (c.609+28\_610-16del), failed to detect any *GNPTG* RNA transcripts. To determine whether c.609+28\_610-16del allele-derived transcripts were subject to nonsense-mediated mRNA decay (NMD), patient fibroblasts were

incubated with the protein synthesis inhibitor anisomycin. An RT-PCR fragment retaining 43 bp of intron 8 was consistently detected suggesting that the 33-bp genomic deletion had elicited NMD. Quantitative real-time PCR and *GNPTG* western blot analysis confirmed that the homozygous microdeletion p.G204VfsX17 had elicited NMD resulting in failure to synthesize *GNPTG* protein. Analysis of the sequences surrounding the microdeletion breakpoints revealed either intrinsic repetitiveness of the deleted region or short direct repeats adjacent to the breakpoint junctions. This is consistent with these repeats having mediated the microdeletions via replication slippage and supports the view that the mutational spectrum of the *GNPTG* gene is strongly influenced by the properties of the local DNA sequence environment. Hum Mutat 30:1–7, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** mucopolidosis type III; MLIII; *GNPTG*; microdeletions; nonsense-mediated mRNA decay

## Introduction

Mucopolidosis type III (MLIII), or pseudo-Hurler polydystrophy, is an autosomal recessive disorder affecting lysosomal hydrolase trafficking (MIM# 252605). The clinical phenotype is variable, ensuring that at least some MLIII patients survive to adulthood [Kornfeld and Sly, 2001]. The clinical manifestations include stiffness of fingers and shoulders, claw hand deformity, short stature, scoliosis, and mild mental retardation. Most patients exhibit mild retinopathy, astigmatism, and cardiac valve involvement, and experience bone pain and disability owing to the destruction of hip joints. Moderate

Additional Supporting Information may be found in the online version of the article.

\*Correspondence to: Mirella Filocamo, Lab. Diagnosi Pre-Postnatale Malattie Metaboliche, Istituto G. Gaslini, Largo G. Gaslini 5 (16147) Genova, Italy or Tommaso Beccari, Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Perugia, Via del Giochetto 06126 Perugia, Italy. E-mail: mirella.filocamo@ospedale-gaslini.ge.it, tbeccari@unipg.it

Grant sponsor: Associazione Italiana Mucopolisaccaridosi.



to severe dysostosis multiplex with vertebral changes are evident upon radiological examination [Kelly et al., 1975].

MLIII is characterized by the abnormal trafficking and subcellular localization of lysosomal enzymes [Kornfeld, 1986; Kornfeld and Sly, 2001]. Newly synthesized enzymes are missorted in the Golgi and subsequently secreted into the extracellular milieu as a consequence of the reduced activity of the Golgi-resident enzyme, UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase (GlcNAc-1-phosphotransferase; E.C. 2.7.8.17) [Kornfeld, 1986; Kornfeld and Sly, 2001]. This enzyme catalyzes the initial step in the synthesis of the mannose 6-phosphate recognition marker on the high mannose-type oligosaccharides of newly synthesized lysosomal enzymes required for receptor-dependent transport to the lysosome. GlcNAc-1-phosphotransferase exists as a heterohexamer comprising three subunits,  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ , encoded by two distinct genes [Bao et al., 1996a, 1996b; Kornfeld and Sly, 2001]. The  $\alpha$  and  $\beta$  subunits contain the catalytic site of the enzyme and are encoded by the GNPTAB gene on chromosome 12q23.2 (MIM# 607840) [Tiede et al., 2005]. Mutations in the GNPTAB gene are responsible for MLII and MLIII alpha/beta [Paik et al., 2005; Tiede et al., 2005; Kudo et al., 2006; Cathey et al., 2008]. The  $\gamma$  subunit (MIM# 607838), which would appear to facilitate recognition of acid hydrolase substrates, is encoded by the 11-exon GNPTG gene located on chromosome 16p13.3 [Raas-Rothschild et al., 2000, 2004; Lee et al., 2007; Bräulke et al., 2008]. A total of eight mutations in the GNPTG gene have so far been described as a cause of MLIII gamma [Raas-Rothschild et al., 2000, 2004; Tiede et al., 2004]. Here, we report the identification and characterization of six novel mutations in the GNPTG gene in patients with MLIII gamma.

## Materials and Methods

### Patients

The diagnosis was suspected upon typical MLIII clinical-radiological findings and increased lysosomal enzyme levels in serum/plasma. The definitive diagnosis was made enzymatically by virtue of significant reductions in the levels of  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -fucosidase,  $\beta$ -hexosaminidase, and  $\alpha$ -mannosidase in fibroblast cell lines derived from the patients. A total of 14 patients, with a clinical phenotype of

MLIII, and taken from 11 unrelated families, were initially studied. However, four of these patients, lacking detectable mutations in the GNPTG gene, were reanalyzed for mutations in the GNPTAB gene and were included in another study (our unpublished results). The 10 patients, affected by MLIII gamma and included in the present study, were derived from five (unrelated) Italian and two Spanish families. In three families (Table 1, Families 1, 2, and 4), samples from an affected sibling were available and were analyzed alongside the corresponding index case samples. Family 7 comprised three patients, but only a sample from the index case was available for molecular analysis.

Apart from the patients from Families 4, 5, and 7, which were lost to follow-up (and whose samples were originally stored in the "Cell Line and DNA Biobank from Patients Affected by Genetic Diseases" collection; www.gasluni.org/labdpmm.htm in 1976, 1989, and 1981, respectively), the other patients are still alive and share a symptomatology characterized by joint mobility restriction, absence of hepatosplenomegaly, and mental retardation. The oldest patient under study (Patient 1-I, Table 1), currently 20 years of age, has developed valvular heart disease.

### Cell Lines

Skin biopsies were taken from MLIII patients and fibroblast cultures established according to standard procedures. Aliquots of the patients' cell lines were also cryopreserved in the Biobank. Following ethical guidelines, all samples obtained for analysis and storage required prior written informed consent using a form approved by the Local Ethics Committee.

### Molecular Analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes and/or cell lines of the affected individuals and their parents by standard methods. PCR amplification of the 11 exons of the GNPTG gene was performed in a total volume of 50  $\mu$ l using DyNAzyme EXT DNA polymerase (Finnzymes OY, Espoo, Finland).

Total RNA was extracted from normal cultured fibroblasts using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), following the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized with oligodT using Superscript<sup>TM</sup> III (Invitrogen, Milano, Italy), accord-

**Table 1. Genotypes Encountered in the 10 Patients Belonging to Seven Unrelated Families**

Family number	Patient number	Patient origin	Sex	Birth year	Age at enzymatic diagnosis (years)	Genotype <sup>a</sup>	
						Allele 1	Allele 2
1	1-I	Italian	F	1987	7	c.611delG (p.G204AfsX6)	c.611delG (p.G204AfsX6)
	1-II	Italian	M	1991	4	c.611delG (p.G204AfsX6)	c.611delG (p.G204AfsX6)
2	2-I	Italian	F	1991	13	c.610-2A>G (p.[G204_K247,G204VfsX28])	c.316G>A# (p.G106S)
	2-II	Italian	M	1995	9	c.610-2A>G (p.[G204_K247,G204VfsX28])	c.316G>A# (p.G106S)
3	3-I	Spanish	M	1996	7	c.640_667del28 (p.E214KfsX37)	c.640_667del28 (p.E214KfsX37)
4	4-I	Spanish	F	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	c.333G>A (p.W111X)	c.333G>A (p.W111X)
	4-II	Spanish	M	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	c.333G>A (p.W111X)	c.333G>A (p.W111X)
5	5-I	Italian	F	1982	7	c.857C>T (p.T286M)	?
6	6-I	Italian	M	1993	6	c.347_349delACA# (p.N116del)	c.347_349delACA# (p.N116del)
7 <sup>c</sup>	7-I	Italian	F	1959	21	c.609+28_610-16del (p.G204VfsX17)	c.609+28_610-del (p.G204VfsX17)

<sup>a</sup>For each mutation, the position in the cDNA (EMBL/GenBank; NM\_032520.3) and protein (NP\_115909) is reported; novel mutations are in bold; # denotes mutations previously reported by Raas-Rothschild et al. [2004] (c.316G>A) and Tiede et al. [2004] (c.347\_349delACA).

<sup>b</sup>Data not available, both patients were enzymatically diagnosed in 1976.

<sup>c</sup>Family with two other affected siblings unavailable for analysis. F, female; M, male; ?, undetected mutation.

ing to the manufacturer's instructions. PCR was performed in a total volume of 50  $\mu$ l using Phusion DNA Polymerase (Finnzymes OY).

Direct sequencing of PCR and RT-PCR products was performed in the forward and reverse directions with the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems [ABI], Foster City, CA) and sequences were analyzed on an ABI PRISM 3700 DNA Analyzer. The PCR and RT-PCR primers are listed in Supporting Table S1 (available online at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1059-7794/suppmat>) together with the annealing temperatures.

Putative mutations were confirmed by sequencing duplicate PCR products. The possibility that the novel missense mutation (p.T286M) was a polymorphism was addressed by screening 50 healthy Italian control subjects for this substitution. Control and patient PCR-products were digested with the restriction endonuclease *Hga*I whose recognition site was abolished by the c.857C>T mutation.

#### Analysis of Nonsense-Mediated mRNA Decay

Fibroblasts obtained from Patient 7-I and a control were grown to 80% confluence and incubated with the protein synthesis inhibitor anisomycin (Sigma, Milano, Italy) at a final concentration of 100  $\mu$ g/ml for 4 hr. Total RNA samples were extracted, reverse-transcribed, and PCR-amplified as described above.

#### Quantitative Real-Time PCR

For real-time PCR, the TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay (ABI) including predesigned probes and primer sets for the human *GNPTG* (Hs00261332\_m1) was used.  $\beta$ -Actin (*ACTB*; Hs99999903\_m1) was selected as a "housekeeping" gene. Real-time PCR reactions using Maxima<sup>™</sup> Probe qPCR Master Mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) were analyzed with the Mx3000P (Stratagene, Amsterdam, the Netherlands) as described previously [Pohl et al., 2007]. The relative expression of *GNPTG* mRNA was normalized to the level of *ACTB* mRNA in the same cDNA sample using the comparative CT method ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

#### Protein Analysis

Fibroblasts from one control and Patients 2-I, 5-I, and 7-I were grown on 60-mm dishes and lysed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Sigma, Deisenhofen, Germany), and incubated for 30 min on ice. After centrifugation at 14,000 *g* for 20 min at 4°C, supernatants were collected and used for measurement of protein content (Protein Assay; Bio-Rad, Hercules, CA). Cell extracts (75  $\mu$ g protein) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (12.5% acrylamide) under reducing conditions and blotted onto nitrocellulose. After blocking with 5% nonfat dry milk in PBS containing 0.1% Tween-20, the membrane was incubated with polyclonal anti-human *GNPTG* antibody [Tiede et al., 2004] overnight followed by incubation with secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) (Dianova, Hamburg, Germany). The immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL).

The activities of the lysosomal enzymes  $\alpha$ -L-iduronidase,  $\beta$ -hexosaminidase and arylsulfatase A in cell extracts of control and patient fibroblasts were determined as previously described [Beesley et al., 2001; Tiede et al., 2004].

#### Bioinformatics Analysis

Sequences flanking the microdeletion breakpoints ( $\pm 50$  bp) were screened for the presence of direct repeats, inverted repeats, and symmetric elements by means of complexity analysis [Gusev

et al., 1999]. In addition, sequences spanning the observed microdeletions, including  $\pm 50$ -bp flanking sequences, were screened for the presence of: 1) specific recombination-associated motifs; and 2) direct and inverted repeats and symmetric elements ( $> 8$  bp in length) that are capable of forming non-B DNA slipped structures, cruciforms, and triplex structures [Bacolla et al., 2004].

#### Mutation Nomenclature

All mutations are described according to current mutation nomenclature guidelines (Human Genome Variation Society, [www.hgvs.org](http://www.hgvs.org)) [den Dunnen and Antonarakis, 2000; den Dunnen and Paalman 2003; Wildeman et al., 2008]. Nucleotide numbering was derived from the cDNA *GNPTG* sequence (GenBank-EMBL accession nos. BC014592; NM\_032520.3) taking nucleotide +1 as the A of the first ATG translational initiation codon.

### Results and Discussion

#### Mutation Detection

Ten patients from seven families with an enzymatic diagnosis and clinicoradiological phenotype of MLIII were analyzed by sequencing all 11 exons (and most of the surrounding intronic regions) of the *GNPTG* gene. The different genotypes identified in the seven unrelated patients are summarized in Table 1. Apart from siblings Patients 2-I and 2-II (who were both compound heterozygotes for the mutations [c.316G>A] and [c.610-2A>G]) and Patient 5-I (heterozygous for the mutation [c.857C>T] in association with an as yet undetected mutation [?]), all other patients were found in the homozygous state. However, only in the case of Families 1, 2, and 6 was parental heterozygosity formally demonstrated. In the remaining cases, parental DNAs were unavailable for analysis (most of the patient samples had been preserved in the Biobank). All patients exhibited a mild clinical phenotype, thereby providing support for earlier observations that mutations in the *GNPTG* gene are generally predictive of a milder MLIII phenotype and a better prognosis than *GNPTAB* gene mutations [Cathey et al., 2008].

The *GNPTG* mutational profile was characterized by eight distinct mutations including six novel lesions: c.333G>A (p.W111X), c.609+28\_610-16del (p.G204VfsX17), c.610-2A>G (p.[G204\_K247del,G204VfsX28]), c.611delG (p.G204AfsX6), c.640\_667del28 (p.E214KfsX37), and c.857C>T (p.T286M).

#### The c.610-2A>G Splice-Site Mutation

The c.610-2A>G transition occurred in the obligate AG dinucleotide of the intron 8 acceptor splice-site. To assess its potential effect on mRNA splicing, the relative strengths of the 5' and 3' splice-site signals were evaluated using the Neural Network (NN) splice prediction program (available at [www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) [Reese et al., 1997]. This in silico analysis predicted that the c.610-2A>G mutation would abolish the 3' splice-acceptor site of intron 8 leading to the skipping of exon 9. However, RT-PCR analysis of Patient 2-I (a compound heterozygote for c.610-2A>G and p.G106S) revealed the presence of an abnormally long transcript in addition to the expected shorter (786 bp) and normally-sized (918 bp) products (Fig. 1A). This result was subsequently confirmed by analysis of cloned products (Fig. 1B). Sequence analysis of the two anomalous RT-PCR products subsequently confirmed not only the in silico-predicted skipping of exon 9 [p.G204\_K247del (786 bp)]



but also a longer splice variant, p.G204VfsX28 (1076 bp), resulting from the retention of introns 8 and 9 (Fig. 2).

Galante et al. [2004] studied intron retention in transcripts from a large number of annotated human genes and provided firm evidence for the preferential retention of introns <100 bp in length. Consistent with this "rule," the lengths of introns 8 and 9, retained in the longer splice variant, are 76 and 82 bp, respectively. The high GC content of these two introns (71% and 57%, respectively) also concurs with an earlier finding that eukaryotic introns with a high GC content tend to display lower excision efficiency [Goodall and Filipowicz, 1991].

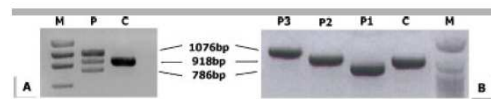
To explore the possible underlying mechanism of generation of the longer splice variant, we performed an in silico analysis of the splice sites and intronic sequences in the immediate vicinity of the lesion, both in the presence and absence of the c.610-2A>G mutation. As mentioned above, the c.610-2A>G mutation completely abolished an acceptor splice-site with a near optimal score (Fig. 2). Apart from the canonical donor and acceptor splice-sites of introns 8 and 9, no other potential (cryptic) splice-sites were predicted to be present within the analyzed sequence. Interestingly, although the sequence at the intron 9/exon 10 splice junction was compatible with it being a bona fide 3' acceptor splice-site, it achieved a half normal score (Fig. 2). This notwithstanding, mRNA analysis (by RT-PCR) confirmed that,

in the absence of the intron 8 splice-site mutation, this splice site is still functional in vivo. It is, however, postulated that, in the context of the c.610-2A>G mutation, the use of this already "weak" acceptor site may have been rendered even less efficient. Thus, in at least a proportion of mutant transcripts, neither the intron 8 nor the intron 9 acceptor splice-sites would have been recognized, giving rise to the inclusion of introns 8 and 9 within the longer mRNA species. The retention of introns 8 and 9 served to alter the reading frame, thereby creating a premature termination codon (PTC). However, as is evident, the mutation appeared not to elicit nonsense-mediated mRNA decay (NMD).

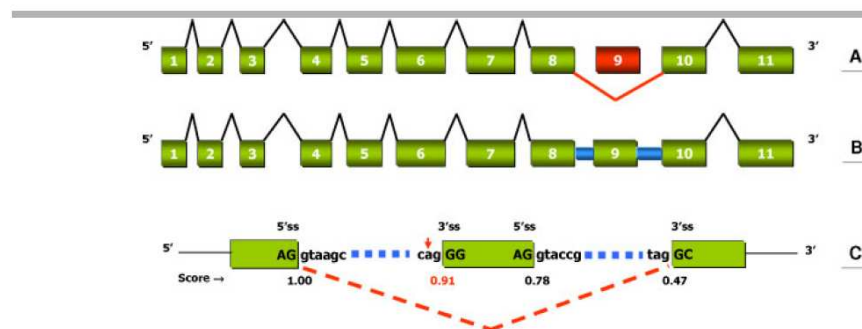
## Missense Mutations

Two of the identified GNPTG gene lesions were missense substitutions. The c.316G>A (G106S) substitution, which lies within a conserved domain (known as protein kinase C substrate 80K-H; PRKCSH), has been previously reported [Raas-Rothschild et al., 2004] whereas the other lesion [c.857C>T (p.T286M)], found in Italian Patient 5-I (Table 1), is novel. Consistent with their pathological authenticity, neither nucleotide change was found in a screen of 50 Italian healthy control subjects nor is either substitution listed as a polymorphism in dbSNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)).

Evidence for the functional significance of the two mutated residues was sought through an analysis of evolutionary conservation by comparing the sequences of eight orthologous vertebrate GNPTG proteins from human to zebrafish. G106 was found to be invariant at this position as were the flanking residues within the PRKCSH domain; such conservation over 500 Myrs of evolutionary time is supportive of the functional significance of this residue and hence the direct involvement of the G106S mutation in disease causation. By contrast, T286 was only found to be conserved in chimpanzee and dog among the vertebrate GNPTG protein sequences examined. However, the substitution of small polar T286, located on the C-terminal helical region of the protein, by a large hydrophobic methionine (286M) residue, might theoretically lead to incorrect positioning of the alpha-helix.



**Figure 1.** RT-PCR on Patient 2-I [c.610-2A>G] + [p.G106S]. **A:** The analysis performed on the RNA sample, PCR amplified by primers 3-11 (Supporting Table S1), revealed the presence of two abnormal transcripts (1,076 bp and 786 bp) in addition to the normally-sized product (918 bp). **B:** The result was confirmed by repeat analysis on the cloned products. Sequence analysis indicated skipping of exon 9 in the shorter product (P1: 786 bp) and the inclusion of introns 8 and 9 in the longer product (P3: 1076). M = 50 bp DNA ladder; P = patient; C = control sample.



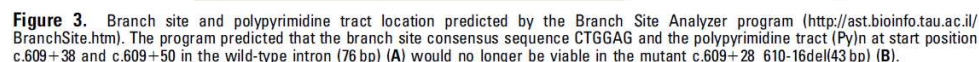
**Figure 2.** Schematic representation of the abnormal GNPTG splice variants in Patient 2-I. In the top half (**A,B**), the two possible aberrant splicing events, resulting from the c.610-2A>G mutation at the invariant 3' splice-site (ss) motifs, are depicted. The 11 exons (boxed) are numbered 1 to 11 whereas the related unnumbered introns are represented as lines. **A:** Green boxes and black lines denote normally processed exons and introns; the red box and lines represent the skipping of exon 9. **B:** Blue boxes indicate retained introns. **C:** In the bottom of the diagram, schematic representation of the wild-type genomic region spanning exons 8, 9, and 10 of the GNPTG gene (together with intervening introns 8 and 9) with the respective 5' donor and 3' acceptor ss motifs (scores predicted by in silico analysis are reported below). It should be noted that donor (5') and acceptor (3') sites are defined by the classical consensus sequences AG/gtRag and (Y)ncag/GT (where R = Purine A/G and Y = Pyrimidine T/C), respectively. A red arrow denotes the site of the point mutation c.610-2A>G which affects the 3' ss motif (with a score of 0.91). Dotted red lines represent an exon skipping variant (**A**) whereas the dotted blue lines represent a variant with retained introns (**B**).

Of the three novel microdeletions detected, two (c.611delG and c.640\_667del28) occurred within exons, whereas c.609+28\_610-16del occurred within intron 8. The exonic deletions, c.611delG and c.640\_667del28, were both frameshifts and are consequently predicted to introduce premature stop codons (p.G204AfsX6 and p.E214KfsX37) that would either lead to the synthesis of truncated protein products or elicit NMD [Maquat, 2004]. Unfortunately, fibroblast mRNA from Patients 1-I, 1-II, and 3-I from the two families affected was not available to ascertain the functional consequences of these protein-truncating mutations *in vivo*.

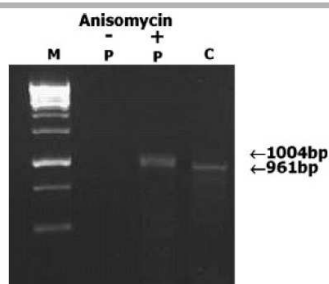
In order to investigate the consequences of this intronic deletion (c.609+28\_610-16del) at the RNA level, RT-PCR was performed using RNA derived from both normal and cultured fibroblasts obtained from Patient 7-I. Although a 961-bp PCR product, corresponding to the length of the correctly processed GNPTG mRNA transcript, was detected in control cells, no PCR amplified products were observed in cells derived from Patient 7-I. One explanation for this finding could be that the deletion not only abrogates normal splicing but also elicits NMD. In order to explore this possibility, fibroblasts obtained from Patient 7-I were incubated with the protein synthesis inhibitor anisomycin for 4 hr in order to block NMD [Noeske

### GNPTG Expression in MLIII Gamma Fibroblasts

To quantify the mRNA levels in these patient cells, real-time PCR was performed. In fibroblasts from Patients 2-I and 5-I, the GNPTG mRNA levels were either weakly affected or unaffected, respectively, as compared with control cells (Fig. 5B). The probe and primer sets used in this study were designed so as to anneal to the junction between exons 2 and 3, thereby allowing the detection of both normally-sized and the two abnormally-sized transcripts in Patient 2-I. Neither the splice site mutation (c.610-2A>G) nor the missense mutation (c.316G>A) were found to elicit NMD. By contrast, in cells from Patient 7-I, the level of the GNPTG mRNA bearing the c.609+28,610-16del lesion was reduced by 90% (Fig. 5B). These data were confirmed by western blot analysis, which revealed GNPTG protein to be undetectable in fibroblasts from Patient 7-I whereas cells from both Patients 2-I and 5-I expressed 34-kDa immunoreactive polypeptides representing GNPTG monomers of the predicted molecular mass [Raas-Rothschild et al., 2000]. Thus, data from





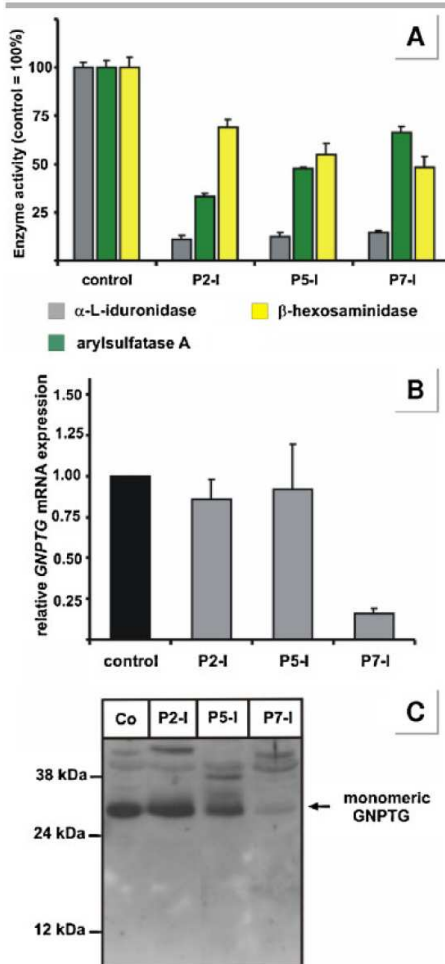


**Figure 4.** NMD assay on fibroblast mRNA from Patient 7-I carrying c.609+28\_610-16del in the homozygous state. The assay was carried out by RT-PCR analysis of *GNPTG* mRNA extracted from anisomycin-treated (+) patient (P) fibroblasts and nontreated (-) fibroblasts. No RT-PCR products were observed in the nontreated sample, whereas a longer fragment (1,004 bp) was detected in the anisomycin-treated sample than in the control sample (C) which exhibited the expected product of size 961 bp. M = marker, GeneRuler 1-kb DNA ladder.

both quantitative real-time PCR and *GNPTG* western blot analysis served to confirm that the homozygous microdeletion p.G204VfsX17 elicited NMD resulting in a failure to synthesize *GNPTG* protein.

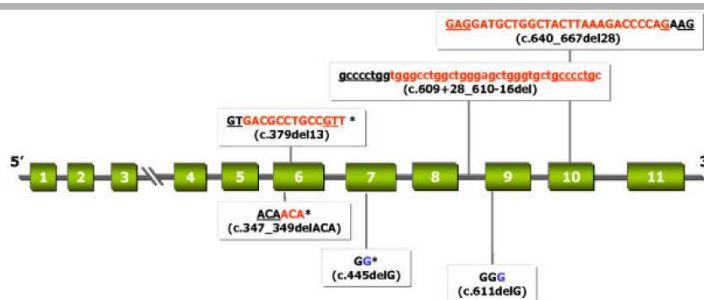
Microdeletions and microinsertions (of  $\leq 20$  bp) account for 17% and 7%, respectively, of the mutations logged in the Human Gene Mutation Database (www.hgmd.org) [Ball et al., 2005]. However, microdeletions and microinsertions represent 5 of the 8 known previously reported mutations in the *GNPTG* gene causing MLIII gamma, and 3 of the 6 novel *GNPTG* gene lesions reported here. The basic mutational mechanisms underlying microinsertions and microdeletions have been previously described and support the view that sequence repetitivity is a robust predictor of both types of lesion [Ball et al., 2005]. Complexity analysis was used to identify both perfect and imperfect short direct repeats adjacent to the breakpoint junctions of deletions c.379del13 [Raas-Rothschild et al., 2004], c.609+28\_610-16del, and c.640\_667del28 in the *GNPTG* gene (Fig. 6); these repeats may have served to mediate the microdeletions via replication slippage. Thus, the short microdeletion c.347\_349delACA [Tiede et al., 2004] is explicable in terms of slipped mispairing operating on two consecutive ACA codons whereas c.445delG [Raas-Rothschild et al., 2004] and c.611delG are characterized by the removal of individual nucleotides from mononucleotide runs. Such lesions have been reported to occur frequently as a cause of human genetic disease [Ball et al., 2005] and have been termed "deduplications" [Kondrashov and Rogozin, 2004].

Several motifs known to be associated with site-specific cleavage/recombination, high-frequency mutation, and gene rearrangement were found within the regions spanning the deletions. Among them were the deletion hotspot motif TGRKKM (where R = A/G, K = G/T, and M = A/C) and its complement, which were found in the vicinity of all the identified mutations. A truncated version of this hotspot motif, TGGAG, known as a "hamster APRT deletion hotspot" [Abeyasinghe et al., 2003] was identified in the immediate vicinity of all the deletion breakpoints. Several examples of the "super-hotspot" motif, CCCAG (and its complement CTGGG), previously described in association with both insertion/deletions and microdeletion/microinsertions [Noensie and Dietz, 2001; Ball et al., 2005], were also identified in the vicinity of all deletions.



**Figure 5.** Quantitative mRNA and protein analysis in Patients 2-I, 5-I, and 7-I. **A:** Lysosomal enzyme activities of  $\alpha$ -L-iduronidase (gray bars),  $\beta$ -hexosaminidase (green bars), and arylsulfatase A (yellow bars) were measured in cell extracts of control and patient fibroblasts. The data were determined in triplicate and are given as the mean  $\pm$  SD. **B:** Quantitative *GNPTG* mRNA expression in control (black bars) and MLIII gamma patient (gray bars) fibroblasts. Data shown represent the mean of triplicate PCRs obtained from two independent RNA preparations and expressed as the fold change  $\pm$  SD. **C:** Expression analysis of *GNPTG* protein in MLIII gamma fibroblasts. Cell extracts of fibroblasts from controls and MLIII gamma patients were analyzed by anti-*GNPTG* western blotting. The positions of the molecular weight markers are indicated. Western blot analysis was repeated twice with similar results.

Taken together, these data are consistent with the view that the mutational spectrum of the *GNPTG* gene is strongly influenced by the properties of the local DNA sequence environment.



**Figure 6.** Schematic representation of the microdeletions in relation to the structure of the *GNPTG* gene. The deleted nucleotides are shown in red. Imperfect short direct repeats, found adjacent to deletion breakpoint junctions, are underlined. Nucleotides involved in “deduplications” are indicated in blue. Asterisks denote deletions described previously [Tiede et al., 2004; Raas-Rothschild et al., 2000, 2004]. The exons are displayed as green boxes (numbered 1–11) whereas the related (unnumbered) introns are denoted as gray lines. Exonic DNA sequence is depicted in uppercase, intronic sequence in lowercase.

## Acknowledgments

Samples were obtained from the “Cell Line and DNA Bank from Patients Affected by Genetic Diseases” (G. Gaslini Institute)-Telethon Genetic Biobank Network (project no. GTB07001A).

## References

- Abeyasinghe SS, Chuzhanova N, Krawczak M, Ball EV, Cooper DN. 2003. Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer. I. Nucleotide composition and recombination-associated motifs. *Hum Mutat* 22:229–244.
- Bacolla A, Jaworski A, Larson JE, Jakupciak JP, Chuzhanova NA, Abeyasinghe SS, O’Connell CD, Cooper DN, Wells RD. 2004. Breakpoints of gross deletions coincide with non-B DNA conformations. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14162–14167.
- Ball EV, Stenson PD, Abeyasinghe SS, Krawczak M, Cooper DN, Chuzhanova NA. 2005. Microdeletions and microinsertions causing human genetic disease: common mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence complexity. *Hum Mutat* 26:205–213.
- Bao M, Booth JL, Elmendorf BJ, Canfield WM. 1996a. Bovine UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. I. Purification and subunit structure. *J Biol Chem* 271:31437–31445.
- Bao M, Elmendorf BJ, Booth JL, Drake RR, Canfield WM. 1996b. Bovine UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. II. Enzymatic characterization and identification of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 271:31446–31451.
- Beesley CE, Meaney CA, Greenland G, Adams V, Vellodi A, Young EP, Winchester BG. 2001. Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations. *Hum Genet* 109:503–511.
- Braulke T, Pohl S, Storch S. 2008. Molecular analysis of the GlcNAc-1-phosphotransferase. *J Inher Metab Dis* 31:253–257.
- Cathey SS, Kudo M, Tiede S, Raas-Rothschild A, Braulke T, Beck M, Taylor HA, Canfield WM, Leroy JG, Neufeld E, McKusick VA. 2008. Molecular order in mucopolipidosis II and III nomenclature. *Am J Med Genet* 146:512–513.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15:7–12.
- den Dunnen JT, Paalman MH. 2003. Standardizing mutation nomenclature: why bother? *Hum Mutat* 2:181–182.
- Galante PA, Sakabe NJ, Kirschbaum-Slager N, de Souza SJ. 2004. Detection and evaluation of intron retention events in the human transcriptome. *RNA* 10:757–765.
- Goodall GJ, Filipowicz W. 1991. Different effects of intron nucleotide composition and secondary structure on pre-mRNA splicing in monocot and dicot plants. *EMBO J* 10:2635–2644.
- Gusev VD, Nemytikova LA, Chuzhanova NA. 1999. On the complexity measures of genetic sequences. *Bioinformatics* 15:994–999.
- Kelly TE, Thomas GH, Taylor HA Jr, McKusick VA, Sly WS, Glaser JH, Robinow M, Luzzatti L, Espiritu C, Feingold M, Bull MJ, Ashenbush EM, Ives EJ. 1975. Mucopolipidosis III (pseudo-Hurler polydystrophy): clinical and laboratory studies in a series of 12 patients. *Johns Hopkins Med J* 137:156–175.
- Kondrashov AS, Rogozin IB. 2004. Context of deletions and insertions in human coding sequences. *Hum Mutat* 23:177–185.
- Kornfeld S. 1986. Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J Clin Invest* 77:1–6.
- Kornfeld S, Sly WS. 2001. I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*, 8th edition. New York: McGraw-Hill. p. 3469–3505.
- Kudo M, Brem MS, Canfield WM. 2006. Mucopolipidosis II (I-cell disease) and mucopolipidosis IIIA (classical pseudo-Hurler polydystrophy) are caused by mutations in the GlcNAc-phosphotransferase alpha/beta-subunits precursor gene. *Am J Hum Genet* 78:451–463.
- Lee WS, Payne BJ, Gelfman CM, Vogel P, Kornfeld S. 2007. Murine UDP-GlcNAc: lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase lacking the gamma-subunit retains substantial activity toward acid hydrolases. *J Biol Chem* 282:27198–27203.
- Maquat LE. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:89–99.
- Noensie EN, Dietz HC. 2001. A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat Biotechnol* 19:434–439.
- Paik KH, Song SM, Ki CS, Yu HW, Kim JS, Min KH, Chang SH, Yoo EJ, Lee JJ, Kwan EK, Han SJ, Jin DK. 2005. Identification of mutations in the GNPTA (MGC4170) gene coding for GlcNAc-phosphotransferase alpha/beta subunits in Korean patients with mucopolipidosis type II or type IIIA. *Hum Mutat* 26:308–314.
- Pohl S, Mitchison HM, Kohlschütter A, van Diggelen O, Braulke T, Storch S. 2007. Increased expression of lysosomal acid phosphatase in CLN3-defective cells and mouse brain tissue. *J Neurochem* 103:2177–2188.
- Raas-Rothschild A, Cormier-Daire V, Bao M, Genin E, Salomon R, Brewer K, Zeigler M, Mandel H, Toth S, Roe B, Munnich A, Canfield WM. 2000. Molecular basis of variant pseudo-Hurler polydystrophy (mucopolipidosis IIIC). *J Clin Invest* 105:673–681.
- Raas-Rothschild A, Bargal R, Goldman O, Ben-Asher E, Groener JE, Toutain A, Stemmer E, Ben-Neriah Z, Flusser H, Beemer FA, Penttinen M, Olender T, Rein AJ, Bach G, Zeigler M. 2004. Genomic organization of the UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gamma subunit (GNPTAG) and its mutation in mucopolipidosis III. *J Med Genet* 41:e52.
- Reese MG, Eckman FH, Kulp D, Haussler D. 1997. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 4:311–323.
- Tiede S, Cantz M, Raas-Rothschild A, Muschol N, Bürger E, Ullrich K, Braulke T. 2004. A novel mutation in UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gamma subunit (GNPTAG) in two siblings with mucopolipidosis type III alters a used glycosylation site. *Hum Mutat* 24:535.
- Tiede S, Storch S, Lubke T, Henrissat B, Bargal R, Raas-Rothschild A, Braulke T. 2005. Mucopolipidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the  $\alpha/\beta$  GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat Med* 11:1109–1112.
- Wildeman M, van Ophuizen E, den Dunnen JT, Taschner PE. 2008. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum Mutat* 29:6–13.
- Yeo G, Hoon S, Venkatesh B, Burge CB. 2004. Variation in sequence and organization of splicing regulatory elements in vertebrate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15700–15705.



## Large Deletion Involving Exon 5 of the Arylsulfatase B Gene Caused Apparent Homozygosity in a Mucopolysaccharidosis Type VI Patient

Guglielmo R.D. Villani,<sup>1,\*</sup> Michela Grosso,<sup>1,\*</sup> Gianfranco Pontarelli,<sup>1</sup> Armando Chierchia,<sup>1</sup> Raffaele Sessa,<sup>1</sup> Michelina Sibilio,<sup>2</sup> Giancarlo Parenti,<sup>2</sup> and Paola Di Natale<sup>1</sup>

Apparent homozygosity for the mutation p.R315X present on exon 5 of the arylsulfatase B (*ARSB*) gene in a mucopolysaccharidosis type VI patient was solved in this study by further testing for a second mutation. Patient cDNA analysis revealed that the entire exon 5 of the *ARSB* gene was lacking; this new mutation was identified as c.899-1142del. As the genomic DNA sequencing excluded the presence of splicing mutations, polymerase chain reaction analysis was performed for polymorphisms listed in the NCBI SNP database for the *ARSB* gene. This allowed the mutation at the genomic DNA level to be identified as g.99367-102002del; this gross deletion, involving the entire exon 5 of the gene and parts of introns 4 and 5 led to a frameshift starting at amino acid 300 and resulting in a protein with 39% amino acids different from the normal enzyme. We stress that extensive DNA analysis needs to be performed in case of apparent homozygosity to avoid potential errors in genetic counseling.

### Introduction

**M**UCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE VI (MPS VI, Maroteaux-Lamy syndrome, MIM 253200) is a lysosomal disease caused by a deficiency in the enzyme *N*-acetylgalactosamine-4-sulfatase (arylsulfatase B [*ARSB*]; EC 3.1.6.12) (Neufeld and Muenzer, 2001). Deficiency of *ARSB* leads to the storage and urinary excretion of high levels of the glycosaminoglycans dermatan sulfate and chondroitin sulfate. MPS VI patients may present with clinical phenotypes within a broad spectrum, ranging from severe to relatively attenuated. Clinical features include growth retardation, coarse facial features, stiff joints, skeletal malformations, respiratory and cardiac problems, corneal clouding, and hepatosplenomegaly. With the cloning of the *ARSB* gene (Peters *et al.*, 1990; Schuchman *et al.*, 1990) and advances in sequencing technology, the identification of *ARSB* mutations was made possible (Litjens and Hopwood, 2001; Karageorgos *et al.*, 2007). Molecular characterization of Italian patients has been previously reported (Villani *et al.*, 1998, 1999).

A mutation analysis was performed for patients enrolled in a trial of enzyme replacement therapy with Naglazyme; in this study the mutant *ARSB* protein and residual activity were determined for each patient and, together with genotype information, were used to predict the expected clinical phenotype (Karageorgos *et al.*, 2004). Very recently, in an attempt to identify molecular markers for the follow-up of enzyme re-

placement therapy, four Italian patients were tested at the DNA level; among these, one patient showed the nonsense mutation p.R315X in apparent homozygosity (Di Natale *et al.*, 2008). Subsequently, when the genetic test was performed on parents' DNA, we found (this study) that the patient carried a second mutation (g.99367-102002del) resulting in the deletion of the entire exon 5 of the gene as well as a part of introns 4 and 5.

Partial or gross gene deletions might be expected for any gene, which might mislead molecular diagnosis. In this respect, proper molecular analyses of the mutated gene, including the analysis of both parents of the patient, are important for subsequent diagnoses such as identification of the carrier state in family members, prenatal diagnosis, and preimplantation genetic diagnosis.

### Materials and Methods

#### Patient and family studies

The patient, born in 2002, has a severe form of MPS VI. At the age of 4 years he underwent enzyme replacement therapy with Naglazyme. On that occasion, a mutation analysis showed the presence of the nonsense mutation p.R315X (c.943C>T) in apparent homozygosity (Di Natale *et al.*, 2008). At that time, however, the DNA of the parents was not available; only after 2 years from the initial molecular diagnosis did the family members ask for their carrier status to be

Departments of <sup>1</sup>Biochemistry and Medical Biotechnologies and <sup>2</sup>Pediatrics, University of Naples Federico II, Naples, Italy.

\*These two authors contributed equally to this work.



defined. The molecular analysis, performed on both parents' DNA, revealed that the father of the patient was not a carrier of the p.R315X mutation. Thus, our laboratory carried out extensive studies of the genomic DNA to seek the second mutation of the patient.

#### DNA and RNA extraction

Genomic DNA was isolated from the blood or from cultured fibroblasts by using the Illustra DNA extraction kit BACC2 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom). Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen, Milan, Italy). DNA and RNA were spectrophotometrically quantified by measuring the absorbance at 260, 280, and 230 nm.

#### Polymerase chain reaction analyses on genomic DNA

The primers for amplification of exon 5 of the *ARSB* gene were the following: ABE1 (5'-TCAGATAACGGAGGGCA GA-3') and ABE2 (5'-GGTACCTGATGGTTTTC CA-3'). Analysis of all the polymorphisms was performed using the oligonucleotides shown in Table 1 and the HotStar Taq Master Mix kit (Qiagen) in the following conditions: 200 ng DNA template was added to a reaction mixture containing 0.025 U/ $\mu$ L Taq, 200  $\mu$ M each dATP, dTTP, dCTP, and dGTP (Amersham Biosciences, Little Chalfont, United Kingdom), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, polymerase chain reaction (PCR) buffer 1 $\times$ , primers 200 nM. Buffer Q was added only for polymorphisms from I4-9 to I4-16 and for I5-7; for these polymorphisms the following PCR program was used: after initial denaturation for 15 min at 95°C, the reactions were subjected to 37 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 56°C for 1 min, and DNA polymerization at 72°C for 1 min, and to a final cycle at 72°C for 10 min. For polymorphisms I4-1 to I4-7 and I5-1 to I5-5 the PCR program was the same except that the annealing temperature was 57°C; for I4-1 and I5-1 the annealing step was for 30 s.

Amplification of the I4-15/I5-f fragment for the patient and his family members was performed using the oligonucleotides shown in Table 1 and the HotStar Taq Master Mix kit (Qiagen) in a 50  $\mu$ L reaction mix containing 10 pmol of each primer, 1.5 U Taq, 200  $\mu$ M each dATP, dTTP, dCTP, and dGTP (Amersham Biosciences), 10  $\mu$ L buffer Q, PCR buffer 1 $\times$ , and 200 ng of DNA. PCR reactions in this case contained three primers, and also the forward primer I5-f was added to the mixture to amplify the I5-f fragment as an internal control for the PCR tests. The following program was used for this amplification: 96°C for 5 min, followed by 32 cycles of 98°C for 45 s, 48°C for 1.5 min, 72°C for 2 min 15 s, and one cycle of 72°C for 7 min.

#### Reverse transcription and *ARSB* cDNA amplification

Total RNA isolated from cultured fibroblasts was reverse transcribed to cDNA as described elsewhere (Wicker *et al.*, 1991). After a first-strand cDNA synthesis, 1  $\mu$ L of cDNA was mixed with 50 pmol of each PCR primer (A4, forward primer and A5, reverse primer) in a total volume of 100  $\mu$ L containing 2.5 units of Taq polymerase (Invitrogen, San Giuliano Milanese, Milan, Italy), 0.2 mM of each dATP, dTTP, dCTP, and dGTP (Amersham Biosciences), 10% (v/v) dimethyl sulfoxide, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatine, and 10 mM Tris-HCl (pH 8.3). After initial denaturation for 5 min at 95°C, the

reactions were subjected to 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 50°C for 1 min, and DNA polymerization at 72°C for 3 min. All amplifications were run with controls, in which no reverse transcriptase had been added during the cDNA synthesis.

#### DNA sequencing

PCR-amplified DNA and cDNA fragments were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and then excised and cleaned using the Qiagen gel extraction kit. The cleaned DNA fragments were directly sequenced, without subcloning, by the dideoxy-termination method and the analysis was performed on an automated DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Monza, Italy). Analysis of electropherograms and alignments of the DNA sequences were performed using the software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA).

#### Southern blot analysis

Genomic DNA (10  $\mu$ g) was digested with *Hpa*I (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) under conditions recommended by the manufacturer. A genomic fragment of 523 bp, corresponding to the 3' end of intron 4 and generated by PCR using the primers I4-7 (forward) and I4-15 (reverse) (Table 1), was used as the probe. Based on reference sequence NC\_000005, the wild-type allele is expected to be 3250 bp and the deleted allele to be 7875 bp.

#### Western blot analysis

Total soluble cellular extract was prepared in lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Fifty micrograms of the extract from the patient fibroblasts were electrophoresed through 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose membranes. Anti-*ARSB* polyclonal antiserum was used at a 1/500 dilution (Tessitore *et al.*, 2008).

### Results

#### DNA analysis of the MPS VI patient and his parents

The patient was previously diagnosed as being apparently homozygous for the p.R315X mutation found on exon 5 of the *ARSB* gene (Di Natale *et al.*, 2008). Subsequently, the availability of DNA from his parents allowed us to reexamine the case. The mother was heterozygous for mutation p.R315X; the father was negative for the mutant allele p.R315X (data not shown).

#### cDNA analysis of the MPS VI patient

As shown in Figure 1 (left), agarose gel electrophoresis of the patient's cDNA revealed the presence of a fragment shorter than that obtained from the normal control. The analysis of the results obtained from cDNA sequencing showed that the patient's cDNA lacked the entire exon 5 of the *ARSB* gene (Fig. 1, right). This new mutation was therefore identified as c.899-1142del.

#### Identification of the novel deletion: Analysis of polymorphisms in the genomic DNA

The genomic DNA sequencing excluded the presence of splicing mutations on the *ARSB* gene of the patient; moreover,



TABLE 1. ANALYZED POLYMORPHISMS AND OLIGONUCLEOTIDES USED IN THIS STUDY

Region	Contig position	dbSNP rs# cluster id <sup>a</sup>	Primers	Oligonucleotide sequence
Intron_4	28844553 <sup>b</sup>	rs 430185	I4-1 Fw	5'-ggagaactgcttgaatccag-3'
			I4-1 Rev	5'-ctgtgatgtgcttgggtg-3'
Intron_4	28838464 <sup>b</sup>	rs 337866	I4-2 Fw	5'-atctgggtaatgggatat-3'
			I4-2 Rev	5'-gtgtaccattaaccatac-3'
Intron_4	28827862 <sup>b</sup>	rs 337845	I4-3 Fw	5'-tttgattctcgcgatgtgc-3'
			I4-3 Rev	5'-gaagagagcactgtggcctt-3'
Intron_4	28817324 <sup>b</sup>	rs 337892	I4-4 Fw	5'-ctggccttcattatcagg-3'
			I4-4 Rev	5'-tgaaacccatctgtacaa-3'
Intron_4	28797184 <sup>b</sup>	rs 337853	I4-5 Fw	5'-atgcttctgtgatgtgc-3'
			I4-5 Rev	5'-cacaagttcccttagccca-3'
Intron_4	28787918 <sup>b</sup>	rs 337879	I4-6 Fw	5'-aaagtgtcgggattacagg-3'
			I4-6 Rev	5'-ccatacattatgccactcc-3'
Intron_4	28777829 <sup>b</sup>	rs 337885	I4-7 Fw	5'-gaggttgaccgtactgtg-3'
			I4-7 Rev	5'-gaagtctaattgccactgc-3'
Intron_4	28792879 <sup>b</sup>	rs 184614	I4-9 Fw	5'-accccttagcagttactcc-3'
			I4-9 Rev	5'-ctgctatgaccattcaggta-3'
Intron_4	28791093 <sup>b</sup>	rs 337828	I4-10 Fw	5'-ttcctgagacggagttgtg-3'
			I4-10 Rev	5'-ctgtgttagcaggatgggt-3'
Intron_4	28789000 <sup>b</sup>	rs 337876	I4-11 Fw	5'-caccaccactagatccatc-3'
			I4-11 Rev	5'-cagactgttacaggcctca-3'
Intron_4	28784575 <sup>b</sup>	rs 337880	I4-12 Fw	5'-ctggcaaaactcagagaac-3'
			I4-12 Rev	5'-gcttctctgtgcttaacca-3'
Intron_4	28782773 <sup>b</sup>	rs 163299	I4-13 Fw	5'-ctccttgctgggtccttag-3'
			I4-13 Rev	5'-ggaagtgtgagcatgagaat-3'
Intron_4	28780430 <sup>b</sup>	rs 337882	I4-14 Fw	5'-agtgggagattgattgag-3'
			I4-14 Rev	5'-ccagtttgctctcagtaa-3'
Intron_4	28777674 <sup>b</sup>	rs 337886	I4-15 Fw	5'-ttgagcacttaggtgtgtc-3'
			I4-15 Rev	5'-gagttctcaatctcaaggga-3'
Intron_4	28776208 <sup>b</sup>	rs 180049	I4-16 Fw	5'-ctccaaagcgcatatcatcg-3'
			I4-16 Rev	5'-cagactttggcagggggtta-3'
Intron_5	28764970 <sup>b</sup>	rs 3114492	I5-1 Fw	5'-cagggtctcactatgtgtc-3'
			I5-1 Rev	5'-gacatcttcagctccactt-3'
Intron_5	28759406 <sup>b</sup>	rs 10942877	I5-2 Fw	5'-agtcttcaggattaggttg-3'
			I5-2 Rev	5'-gacagatcaacgagacagaa-3'
Intron_5	28749510 <sup>b</sup>	rs 3114494	I5-3 Fw	5'-tgtgttctgtctcttcagcattg-3'
			I5-3 Rev	5'-caaaccaaatatcaactgcc-3'
Intron_5	28738454 <sup>b</sup>	rs 3114498	I5-4 Fw	5'-cgtccaacaatgatagactg-3'
			I5-4 Rev	5'-ctgcacattgtgcacatgtac-3'
Intron_5	28730256 <sup>b</sup>	rs 813049	I5-5 Fw	5'-agttcctggcattttggac-3'
			I5-5 Rev	5'-aatcccaaacactgcta-3'
Intron_5	28749761 <sup>b</sup>	rs 3114493	I5-7 Fw	5'-acaatgggtcctctctaag-3'
			I5-7 Rev	5'-ggcatattagtccctgaagt-3'
Intron_5	118712 <sup>c</sup> 119126 <sup>c</sup>	—	I5-b Fw	5'-tcaaaatcatttccatccag-3'
			I5-b Rev	5'-ttaagtctgcagaggttact-3'
Intron_5	115031 <sup>c</sup> 115560 <sup>c</sup>	—	I5-c Fw	5'-atttctgagggtcctgttc-3'
			I5-c Rev	5'-atcctgagactttgtgaag-3'
Intron_5	107281 <sup>c</sup> 107992 <sup>c</sup>	—	I5-d Fw	5'-ttcataagggttgattgaca-3'
			I5-d Rev	5'-tccacataactaacaagagaac-3'
Intron_5	104591 <sup>c</sup> 105001 <sup>c</sup>	—	I5-e Fw	5'-atacataaaaatgaacgatttc-3'
			I5-e Rev	5'-aaatagcttctgatttaacttg-3'
Intron_5	101521 <sup>c</sup> 102041 <sup>c</sup>	—	I5-f Fw	5'-tgccagttgtgataagtgcc-3'
			I5-f Rev	5'-aatagcaggtttcaggtctc-3'

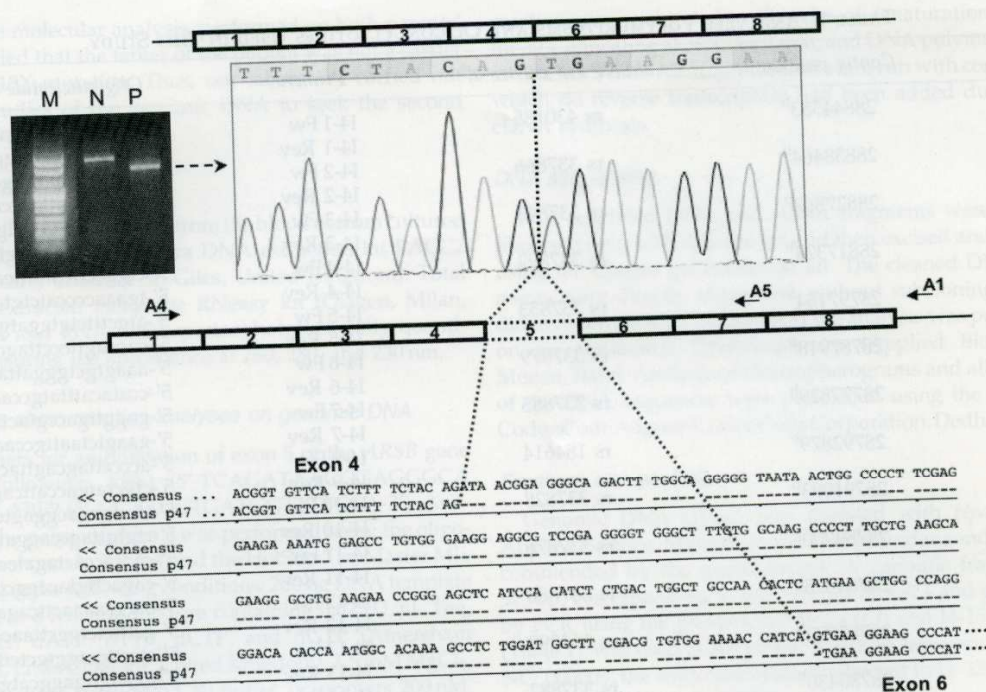
<sup>a,b</sup>Position or rs# cluster id refers to contig NT 066713.14, as reported in the PubMed SNP database.

<sup>c</sup>Position refers to the first 5' base of the oligonucleotide on the sequence NC\_000005.

the large size of both introns 4 and 5 did not allow us to perform direct sequencing. Therefore, we extended the study by performing PCR analysis of polymorphisms listed in the NCBI SNP database for the *ARSB* gene ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)). The polymorphisms analyzed in this set of experiments, and the oligonucleotides used for this analy-

sis and their position along the *ARSB* gene are shown in Figure 2A (thick boxes) and Table 1. As shown in Figure 2A, the patient appeared to be heterozygous up to polymorphism I4-15 in intron 4 of the *ARSB* gene and up to polymorphism I5-7 in intron 5 of the gene. These results might arise the suspicion of a deletion, possibly restricted to the sequence





**FIG. 1.** cDNA analysis of the mucopolysaccharidosis type VI patient. *ARSB* cDNAs were PCR amplified using oligonucleotides A4 and A5 and sequenced. Top left: Agarose gel electrophoresis of A4/A5 amplification. M, DNA molecular weight marker VIII (Roche Applied Science); N, normal control; P, patient. Top right: Analysis of data obtained from sequencing. The top panel shows the electropherogram obtained by sequencing the patient cDNA and the resulting *ARSB* mutant cDNA; the bottom panel shows the alignments between the normal and the patient cDNA partial sequences. *ARSB*, arylsulfatase B; PCR, polymerase chain reaction.

delimited by polymorphisms I4-15 and I5-7. To further characterize this region, additional polymorphisms not reported in the SNP NCBI database were examined on the 5' end of intron 5 (identified by lower-case letters in Fig. 2A and Table 1). As shown in Figure 2A, the patient proved to be heterozygous in fragments I5-b and I5-c and homozygous in fragments I5-e and I5-f; this suggested a further restriction of the area of the possible deletion.

#### Identification of the novel deletion: Genomic DNA analysis in the region around exon 5

To determine the exact extent of the *ARSB* gene deletion, PCR amplification was performed using three primers: I4-15 (forward), I5-f (forward), and I5-f (reverse). In these conditions the I4-15 forward/I5-f-reverse amplification was possible only for an allele with a gross deletion, because the normal allele would give a fragment with more than 2500 bases, impossible to obtain in our PCR conditions. The primer pair forward I5-f/reverse I5-f, in the same PCR, amplified a fragment of ~600 bp, which was used as an internal control. As shown in Figure 2B, from this PCR analysis only the patient's DNA amplified two fragments, one of 600 bp. The sequencing and the following analysis of the second, shorter band showed that it corresponded to a fragment lacking the nucleotides from 99367 to 102002 according to the numbering of the *ARSB* gene sequence NC\_000005 of the PubMed database (Fig. 2B).

These results imply that the second mutant allele of our patient bears the alteration g.99367-102002del, that is, a deletion of 2635 bp including exon 5 of the *ARSB* gene and part of introns 4 and 5. Therefore, the correct genotype of the patient is p.R315X/g.99367-102002del.

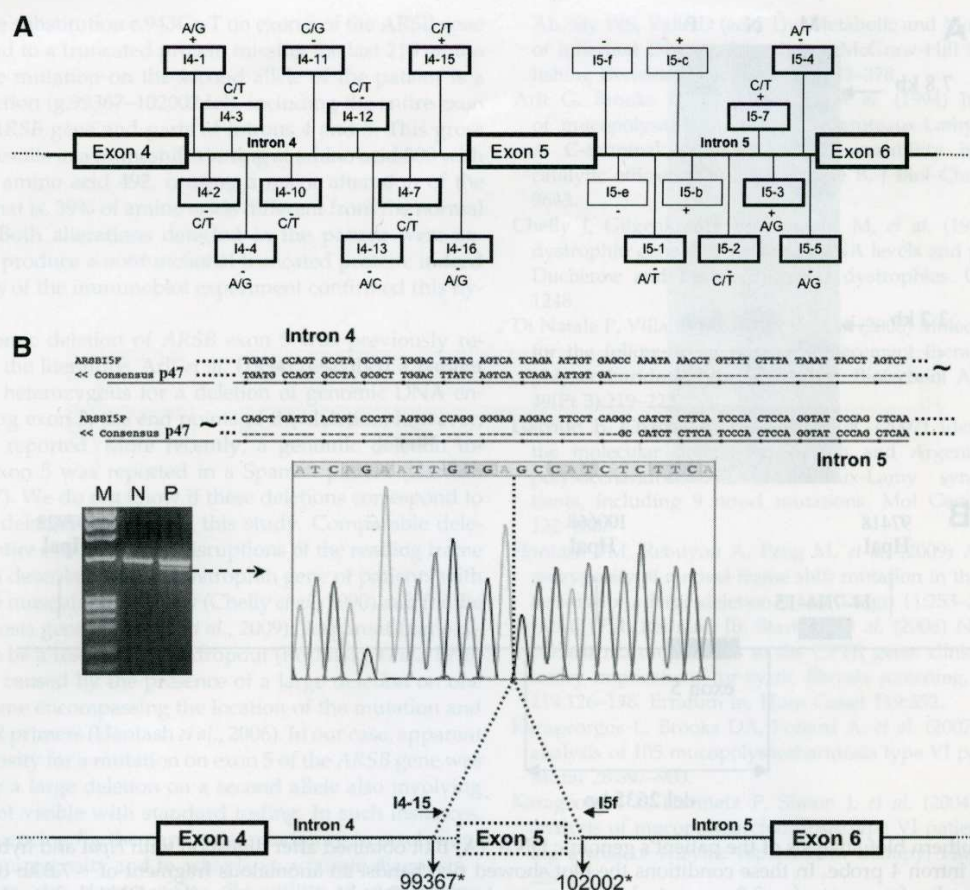
#### Southern blot analysis of the patient's genomic DNA

The analysis of the genomic DNA digested with *HpaI* and hybridized to a probe located in the 3' region of the *ARSB* intron 4 revealed in the patient the presence of an abnormal fragment of ~7.8 kb along with the normal fragment of ~3.2 kb, as expected from the restriction map for a heterozygous condition (Fig. 3A). This pattern corresponded to what was expected from the deletion g.99367-102002del, which removes a restriction site for *HpaI* at position 100668 (Fig. 3B).

#### Western blot analysis

In the cells expressing the normal *ARSB* protein the immunoblot analysis showed the 66 and 43 kDa bands corresponding to the precursor and the mature forms of the enzyme, respectively (Litjens and Hopwood, 2001). In patient's cells, no precursor form was detectable (probably because of a reduced stability of the mutant protein) and a low MW form of 41 kDa was found, very faint compared with the wild-type enzyme (Fig. 4).





**FIG. 2.** Identification of the novel deletion. (A) Polymorphisms analyzed in the *ARSB* genomic DNA. *ARSB* gene exons 4–6 and introns 4 and 5 are shown; the boxes in the intronic regions refer to the polymorphisms analyzed, with the nomenclature as shown in Table 1, the polymorphic bases, if known, and the genotype found for the patient (+, heterozygous; –, homozygous). (B) Genomic DNA analysis in the flanking regions of exon 5. Genomic DNA from patient (P) or from a normal control (N) was subjected to PCR using primers I4-15 (forward), I5-f (forward), and I5-f (reverse) as described in Materials and Methods section. M, DNA molecular weight marker IX (Roche Applied Science). In these conditions the forward I4-15/reverse I5-f amplification was possible only for an allele with a gross deletion, because the normal allele would originate a fragment of more than 2500 bases, not achievable in our PCR conditions. The primer pair forward I5-f/reverse I5-f, in the same PCR, amplified a fragment of ~600 bp, used as an internal control. The figure shows agarose gel electrophoresis of the PCR amplification, the electropherogram obtained from the sequencing of the lower molecular weight PCR product (dashed arrow), the alignments of normal and patient partial sequences, and a schematic illustration of the *ARSB* gene depicting the breakage points located on the genomic DNA (vertical arrows). \*The numbers represent the position of the first and last base of the genomic deletion found and refer to sequence n. NC\_000005 of the PubMed database.

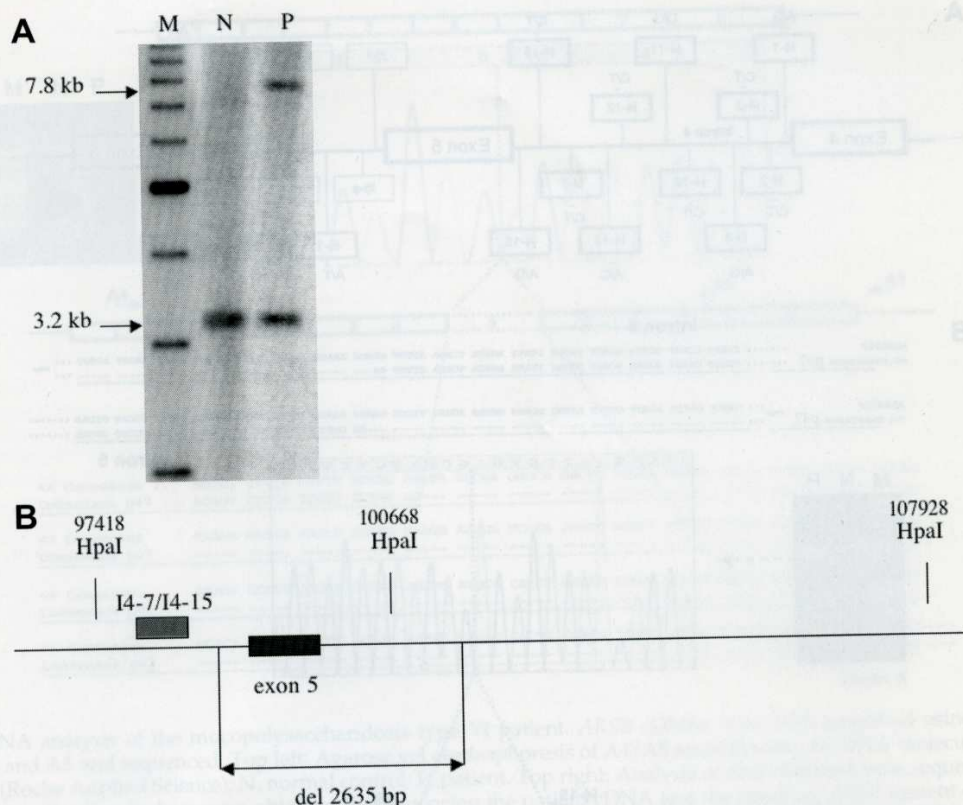
#### Analysis of the patient's family for the g.99367–102002 deletion

After the identification of the second mutant allele in the patient, molecular analysis was performed for the family. PCR analysis of the whole family was performed using the primers I4-15 (forward), I5-f (forward), and I5-f (reverse), as stated earlier. As expected, the mother of the patient did not show the lower molecular weight band corresponding to the deleted allele, whereas the father was heterozygous for the g.99367–102002 deletion. Finally, the PCR analysis allowed us to establish the heterozygous status for the g.99367–102002 deletion for the sister of the index case (Fig. 5).

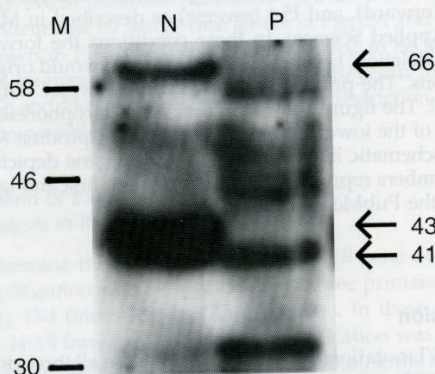
#### Discussion

MPS VI mutations have been identified in all three domains of the *ARSB* polypeptide: the amino-terminal 43 kDa species, the central 7 kDa species, and the carboxyl-terminal 8 kDa species (Litjens and Hopwood, 2001; Karageorgos *et al.*, 2007). Thus far, a total of 128 clinically relevant mutations have been identified in the human gene, with the missense mutations being the largest group. Nonsense mutations and small insertions or deletions comprise the remainder, resulting from transitions in a CpG dinucleotide (Antonarakis *et al.*, 2001).

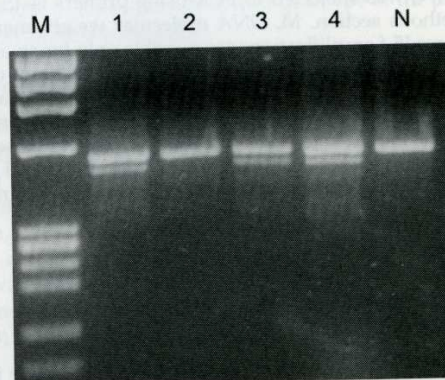
The p.R315X mutation on the first allele of our patient was previously reported (Voskoboeva *et al.*, 2000) to result from



**FIG. 3.** Southern blot analysis of the patient's genomic DNA. (A) Blot obtained after digestion with *HpaI* and hybridization to an *ARSB* intron 4 probe. In these conditions the blot showed two bands: an anomalous fragment of ~7.8 kb only in the patient (P) and a fragment of ~3.2 kb present also in a normal control (N). M, size marker (1 kb DNA ladder; Invitrogen, Carlsbad, CA). (B) Representation of the *HpaI* restriction map of the *ARSB* region including exon 5 (black box) and parts of introns 4 and 5 showing the position of the fragment I4-7/I4-15 used as the probe (gray box). The positions of *HpaI* restriction sites are also shown above each site.



**FIG. 4.** Western blot analysis. Total extracts from normal and patient fibroblasts were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by Western blotting with anti-*ARSB* antiserum. The normal *ARSB* protein showed the 66 kDa band (precursor form) and the 43 kDa band (mature form) of the enzyme (N). In patient's cells, no precursor form was found and a lower MW mature form of the enzyme was detectable (P). M, protein marker in kDa (Broad Range; New England Biolabs, Hertfordshire, United Kingdom).



**FIG. 5.** Analysis of the patient's family for the g.99367-102002 deletion. Genomic DNA from the patient (1), the mother (2), the father (3), the sister (4), or a normal control (N) was subjected to PCR analysis using primers I4-15 forward, I5-f forward, and I5-f reverse as reported in Figure 2A. M, DNA molecular weight marker IX (Roche Applied Science). The presence of a double band for the patient, the father, and the sister was indicative of heterozygosity for the g.99367-102002 deletion.



nucleotide substitution c.943C>T on exon 5 of the *ARSB* gene and to lead to a truncated protein missing the last 218 amino acids. The mutation on the second allele of the patient is a gross deletion (g.99367–102002del), including the entire exon 5 of the *ARSB* gene and parts of introns 4 and 5. This gross deletion results in a frameshift starting at amino acid 300 with a stop at amino acid 492, causing a major alteration of the protein, that is, 39% of amino acids different from the normal enzyme. Both alterations detected in the patient were expected to produce a nonfunctional truncated protein; indeed the results of the immunoblot experiment confirmed this hypothesis.

A genomic deletion of *ARSB* exon 5 was previously reported in the literature: Arlt *et al.* (1994) described a patient who was heterozygous for a deletion of genomic DNA encompassing exon 5; the end points of the deletion, however, were not reported. More recently, a genomic deletion including exon 5 was reported in a Spanish patient (Garrido *et al.*, 2007). We do not know if these deletions correspond to the same deletion reported in this study. Comparable deletions of entire exons causing disruptions of the reading frame have been described for the dystrophin gene of patients with Duchenne muscular dystrophy (Chelly *et al.*, 1990) and for the cystic fibrosis gene (Hantash *et al.*, 2009). Apparent homozygosity can be a result of allele dropout (Rechitsky *et al.*, 1998) or can be caused by the presence of a large deletion on one chromosome encompassing the location of the mutation and of the PCR primers (Hantash *et al.*, 2006). In our case, apparent homozygosity for a mutation on exon 5 of the *ARSB* gene was caused by a large deletion on a second allele also involving exon 5, not visible with standard testing. In such instances, DNA sequencing for the parents is mandatory to resolve apparent homozygosity and to achieve an accurate diagnosis.

Our case also demonstrates the utility of reexamining previous cases. For instance, for MPS VI patients where only one mutation was identified on exon 5 of the gene but the second mutation was not found, it would be useful to retest the patient's DNA for the new mutation reported here (g.99367–102002del). On the other hand, it should be noted that gross deletions could also involve other exons of the *ARSB* gene and may not be evident using standard procedures, because of the primers falling within the deletion. In these cases, one should search for sequences such as SNP on the various *ARSB* exons: the presence of a heterozygous state for the SNP would exclude the presence of gross deletions involving that particular exon. In conclusion, extensive DNA sequencing needs to be performed to characterize exon deletions.

# Acknowledgments

Financial support was provided by Telethon (grant GGP07043). The authors thank Dr. John Hopwood, Women's and Children's Hospital, North Adelaide, Australia, for providing the *ARSB* antibody.

# Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

# References

Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN (2001) The nature and mechanisms of human gene mutation. In: Scriver CR, Beaudet

- AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edition. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, pp 343–378.
- Arlt G, Brooks DA, Isbrandt D, *et al.* (1994) Juvenile form of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). A C-terminal extension causes instability but increases catalytic efficiency of arylsulfatase B. *J Biol Chem* 269:9638–9643.
- Chelly J, Gilgenkrantz H, Lambert M, *et al.* (1990) Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Cell* 63:1239–1248.
- Di Natale P, Villani GR, Parini R, *et al.* (2008) Molecular markers for the follow-up of enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis type VI disease. *Biotechnol Appl Biochem* 49(Pt 3):219–223.
- Garrido E, Chabás A, Coll MJ, *et al.* (2007) Identification of the molecular defects in Spanish and Argentinian mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome) patients, including 9 novel mutations. *Mol Genet Metab* 92:122–130.
- Hantash FM, Rebuyon A, Peng M, *et al.* (2009) Apparent homozygosity of a novel frame shift mutation in the CFTR gene because of a large deletion. *J Mol Diagn* 11:253–256.
- Hantash FM, Redman JB, Starn K, *et al.* (2006) Novel and recurrent rearrangements in the CFTR gene: clinical and laboratory implications for cystic fibrosis screening. *Hum Genet* 119:126–136. Erratum in: *Hum Genet* 119:352.
- Karageorgos L, Brooks DA, Pollard A, *et al.* (2007) Mutational analysis of 105 mucopolysaccharidosis type VI patients. *Hum Mutat* 28:897–903.
- Karageorgos L, Harmatz P, Simon J, *et al.* (2004) Mutational analysis of mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a trial of enzyme replacement therapy. *Hum Mutat* 23:229–233.
- Litjens T, Hopwood JJ (2001) Mucopolysaccharidosis type VI: structural and clinical implications of mutations in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. *Hum Mutat* 18:282–295.
- Neufeld EF, Muenzer J (2001) The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edition. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, pp 3421–3452.
- Peters C, Schmidt B, Rommerskirch W, *et al.* (1990) Phylogenetic conservation of arylsulfatases. cDNA cloning and expression of human arylsulfatase B. *J Biol Chem* 265:3374–3381.
- Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, *et al.* (1998) Allele dropout in polar bodies and blastomeres. *J Assist Reprod Genet* 15:253–257.
- Schuchman EH, Jackson CE, Desnick RJ (1990) Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity with arylsulfatases A and C. *Genomics* 6:149–158.
- Tessitore A, Faella A, O'Malley T, *et al.* (2008) Biochemical, pathological and skeletal improvement of mucopolysaccharidosis VI after gene transfer to liver but not to muscle. *Mol Ther* 16:30–37.
- Villani GR, Balzano N, Di Natale P (1998) Two novel mutations of the arylsulfatase B gene in two Italian patients with severe form of mucopolysaccharidosis. Mutation in brief no. 127. Online. *Hum Mutat* 11:410.
- Villani GR, Balzano N, Vitale D, *et al.* (1999) Maroteaux-Lamy syndrome: five novel mutations and their structural localization. *Biochim Biophys Acta* 1453:185–192.



- Voskoboeva E, Krasnopol'skaia KD, Peters K, von Figura K (2000) Identification of mutations in the arylsulfatase B gene in Russian mucopolysaccharidosis type VI patients. *Genetika* 36:837-843.
- Wicker G, Prill V, Brooks D, et al. (1991) Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). An intermediate clinical phenotype caused by substitution of valine for glycine at position 137 of arylsulfatase B. *J Biol Chem* 266:21386-21391.

Address correspondence to:

Paola Di Natale, M.D., Ph.D.

Department of Biochemistry and Medical Biotechnologies

University of Naples Federico II

Via Sergio Pansini n. 5

80131 Naples

Italy

E-mail: dinatale@unina.it

## SHORT COMMUNICATION

# Identification of novel *L2HGDH* gene mutations and update of the pathological spectrum

Laura Vilarinho<sup>1</sup>, Sandra Tafulo<sup>1</sup>, Michelina Sibilio<sup>2</sup>, Fernando Kok<sup>3</sup>, Federica Fontana<sup>2</sup>, Luisa Diogo<sup>4</sup>, Margarida Venâncio<sup>4</sup>, Mariana Ferreira<sup>1</sup>, Celia Nogueira<sup>1</sup>, Carla Valongo<sup>1</sup>, Giancarlo Parenti<sup>2</sup>, António Amorim<sup>5,6</sup> and Luisa Azevedo<sup>5</sup>

L-2-hydroxyglutaric aciduria (L-2-HGA; MIM 236792) is a neurometabolic disorder caused by the toxic accumulation of high concentration of L-2-hydroxyglutaric acid in plasma and cerebrospinal fluid. Distinct mutations on the *L2HGDH* gene have been associated with the clinical and biochemical phenotype. Here we present three novel mutations (Gln197X, Gly211Val and c.540+1 G>A), which increase the present deleterious collection of *L2HGDH* gene up to 35 mutations that we have compiled in this study. In addition, we used the haplotypic information based on polymorphic markers to demonstrate the common origin of Gly57Arg harboring chromosomes.

*Journal of Human Genetics* (2010) 55, 55–58; doi:10.1038/jhg.2009.110; published online 13 November 2009

**Keywords:** common origin; haplotypic structure; *L2HGDH* gene; mutational spectrum; novel mutations; organic aciduria

L-2-hydroxyglutaric aciduria (L-2-HGA; MIM 236792) is a rare neurometabolic disorder biochemically characterized by the presence of high levels of L-2-hydroxyglutaric acid in plasma, cerebrospinal fluid and urine.<sup>1</sup> Although the biochemical hallmark, the L-2-hydroxyglutaric acid, was identified approximately three decades ago, the identification of both molecular and enzymatic defects was only recently established. It is now known that the mutated gene in L-2-HGA affects subject maps at chromosome 14q22<sup>2,3</sup> and encodes a FAD-dependent enzyme<sup>2</sup> known as L-2-hydroxyglutaric acid dehydrogenase.<sup>2,4,5</sup>

Once clarified the molecular basis involved in L-2-HGA, the reports of co-segregating mutations started to increase and are now available for several populations. At the time of this study, 32 distinct mutations found in a total of 50 affected families are known from several distinct populations.<sup>2,3,6–10</sup> An interesting outcome of these population-specific screenings is that, in addition to the wide mutational spectrum of *L2HGDH* gene, high levels of population heterogeneity concerning the type and frequency of each mutation are also observed. To the best of our knowledge, only Pro302Leu has been repeatedly documented in different populations<sup>3,6,7</sup> remaining unknown if the affected chromosomes share a common origin, or alternatively, if it has occurred through distinct mutational events.

As pathological heterogeneity exists when distinct populations are considered, a better and refined understanding of the mutational

dynamics at *L2HGDH* locus would welcome more population-based studies. In this perspective, we investigated six previously unreported patients belonging to affected families of Portuguese (families 1 and 2), Brazilian (family 3) and Italian (families 4 and 5) ancestry following routinely molecular procedures, as previously described.<sup>6</sup> Informed consent was obtained for all the collections. All the patients showed high levels of L-2-hydroxyglutaric acid in urine. Clinical phenotype was documented as follows:

**Family 1:** The patient is the second child of healthy non-consanguineous Portuguese individuals. A tonic-clonic seizure was noticed within 23 months of age and not repeated. The EEG was normal. Relative macrocephaly and slight global psychomotor retardation were recorded. By 4 years of age, developmental coefficient was 80. Magnetic resonance imaging (MRI) of the brain at 4 years of age disclosed subcortical leukodystrophy and hyperintensity of the cerebellar nuclei. At present, except for moderate mental retardation and macrocephaly, physical examination is normal.

**Family 2:** The patient is the second child of healthy non-consanguineous Portuguese couple. Slight psychomotor retardation with independent walking by 18–24 months and speaking by 18–36 months of age and slight kinetic tremor were reported. By 4 years of age gait disturbance caused orthopedic consultation. She was first observed at 6 years because of ataxia, intentional tremor, dysmetria, disartria and poor speech. At 8 years, the cerebral CT showed leukodystrophy. The brain MRI at 10 years of age showed subcortical leukodystrophy.

<sup>1</sup>Medical Genetics Center, National Health Institute-INSa, Porto, Portugal; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Federico II University, Naples, Italy; <sup>3</sup>Department of Clinical Neurology, University of Sao Paulo School of Medicine, Sao Paulo, Brazil; <sup>4</sup>Metabolic Disorders Unit, Medical Genetics Unit, Children Hospital of Coimbra, Coimbra, Portugal; <sup>5</sup>Institute of Pathology and Molecular Immunology of the University of Porto-IPATIMUP, Porto, Portugal and <sup>6</sup>Faculty of Sciences, University of Porto, Porto, Portugal  
Correspondence: Dr L. Vilarinho, Medical Genetics Center, INSA, Praça Pedro Nunes, 88, Porto 4099-028, Portugal.  
E-mail: laura.vilarinho@igm.min-saude.pt

Received 18 June 2009; revised 1 October 2009; accepted 5 October 2009; published online 13 November 2009



At 10 and 12 years of age, global IQ was 69 and 62, respectively. Progressive gait disturbance, with pyramidal syndrome ensued.

**Family 3:** The two sister patients, currently at 30 and 33 years of age, were born from consanguineous Brazilian parents. Both present similar clinical phenotype. Specifically, both have cognitive retardation, epilepsy and axial ataxia. The brain MRI showed leukodystrophy suggestive of L-2-HGA.

**Family 4:** The patient was born at term after an uneventful pregnancy. Consanguineous parents (second cousins) are healthy individuals. In the first few months after birth a psychomotor delay was evident. MRI at 4 years of age revealed generalized white-matter signal abnormalities in the cerebral subcortical regions (imaging features of a subcortical leukoencephalopathy) with a loss of signal on T<sub>1</sub>-weighted slices and an increase in signal intensity on T<sub>2</sub>-weighted images. The corpus callosum appeared normal. The dentate nuclei showed abnormally high T<sub>2</sub>-weighted signals; also cerebellar vermis hypoplasia was observed. At present, the patient's clinical picture is being characterized by psychomotor delay (IQ=47), intentional tremor, motor dysfunction with ataxia, pyramidal and extrapyramidal signs. He is able to walk without support.

**Family 5:** The patient is the only child of healthy unrelated parents of Italian ancestry. No significant abnormalities were noted in the first year of life, but a slight developmental delay became evident after the first year. At the age of 5 years, he experienced a febrile generalized seizure. The MRI showed white-matter signal abnormalities in cerebral subcortical regions (subcortical leukoencephalopathy) with the involvement of globus pallidus without thalamic lesion. The periventricular white matter was less involved, and the corpus callosum appeared normal on T<sub>2</sub>-weighted sections. A hyperintense signal in the anterior limbs of the internal capsules and the entire external capsules was noted. Diffuse abnormalities in the cerebellum (dentate nuclei) were observed. Slight atrophy cortical was present. At 7 years of age, because of recurrent epileptic episodes, therapy with anti-epileptic treatment (valproic acid and clobazam) was started with good response. At present, the patient is showing mild psychomotor delay (IQ=63), tremor, mild motor dysfunction with ataxia. He is able to walk without support.

Once the clinical and biochemical phenotype had been established, molecular studies were performed in an attempt to detect the disease-associated mutation. The resulting data are presented in Table 1. A total of five distinct mutations were identified, three of which represented novel disease-associated mutations (Gln197Stop, Gly211Val and c.540+1 G>A), and the remaining (His98Arg and Gly57Arg) corresponding to previously documented replacements.<sup>6</sup> Regarding the Gly211Val, the replacement of a small conserved residue by a long side-chain valine might have some impact on the structure of the protein. No studies were possible in the Brazilian control population, although both adult sisters show phenotypic features of L-2-HGA.

In what concerns the c.540+1 G>A and Gln197Stop replacements found in the same patient (family 5), though it is impossible to predict the impairment that a mutation affecting the consensus

**Table 2** Mutational spectrum of *L2HGDH* gene

Nucleotide substitution	mRNA/Protein substitution	Reference
<i>Missense/nonsense</i>		
164G>A	Gly55Asp	3
169G>A	Gly57Arg	6
185C>A	Ala62Asp	8
208C>T	Arg70X	6
241A>G	Lys81Glu	2
292C>T	His98Tyr	3
293A>G	His98Arg	6
459T>A	Tyr153X	3
467G>T	Gly156Val	7
528 G>T	Glu176Asp	2
584A>G	Tyr195Cys	7
589C>T	Gln197X	This work
632G>T	Gly211Val	This work
751C>T	Arg251X	7
788C>T	Ser263Leu	7
788C>G	Ser263X	9
802G>T	Glu268X	7
887C>T	Val296Glu	10
905C>T	Pro302Leu	3
1003C>T	Arg335X	3
1301A>C	His434Pro	6
1319C>A	Ser440Tyr	7
<i>Splicing errors</i>		
257-2A>G	—	6
540+1G>A	—	This work
739-2A>G	—	3
906+1G>C	—	3
907-2A>G	—	6
<i>Indels</i>		
408+1_408+5delGTATG	—	7
529delC	Pro177HisfsX182	6
557_560delATTG	Asp186ValfsX213	7
601delIT	Ser201HisfsX214	7
1015delA	Arg339AspfsX351	7
1115delIT	Met372CysfsX382	3
<i>Large deletions</i>		
Del E1-E9	—	3
DelE9	—	2

**Table 1** Molecular findings in five L-2-hydroxyglutaric aciduria (L-2-HGA) affected families

Family	Origin	Nucleotide substitution	mRNA/Protein substitution	Status
1	Portuguese female	c.293A>G	p.His98Arg	Homozygosity
2	Portuguese female	c.293A>G	p.His98Arg	Homozygosity
3	Brazilian sisters	c.632 G>T <sup>a</sup>	p.Gly211Val	Homozygosity
4	Italian male	c.169A>G	p.Gly57Arg	Homozygosity
5	Italian male	c.540+1 G>A <sup>a</sup> /c.589 C>T <sup>a</sup>	Donor splice error in intron 4/p.Gln197Stop	Heterozygosity

<sup>a</sup>Previously unreported mutations.



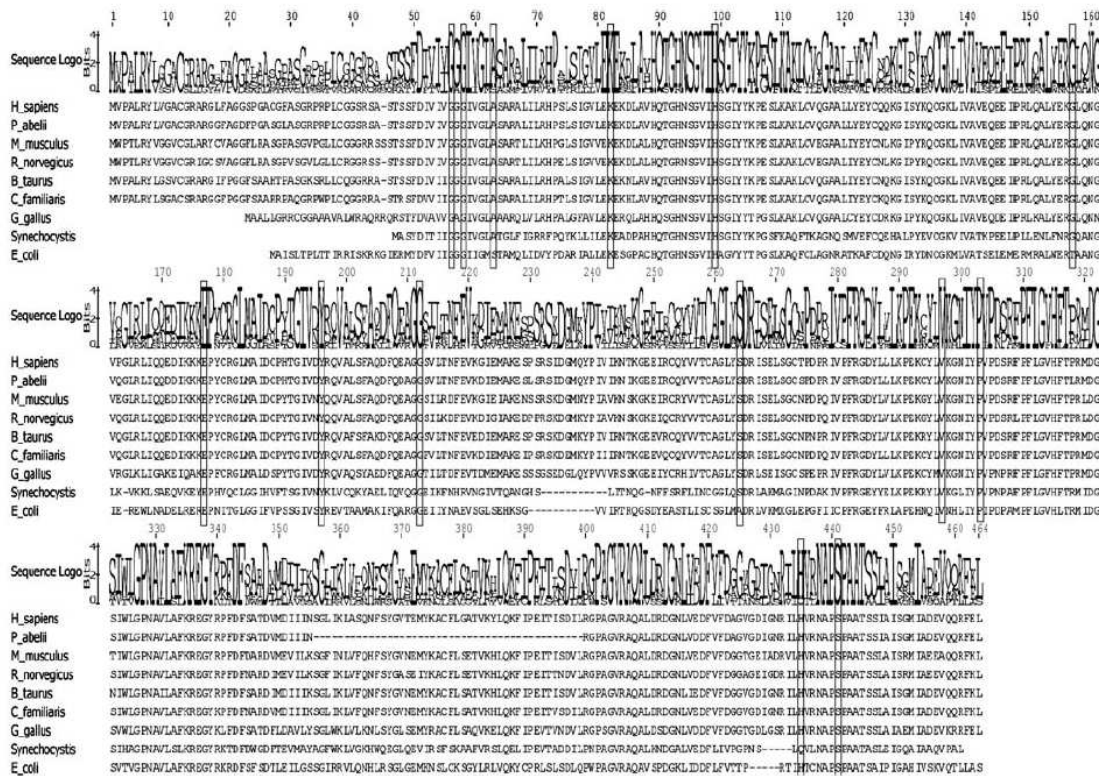
GT donor splice site<sup>11</sup> would have because alternative spliced forms may be formed, we foresee a complete absence of activity caused by the p.Gln197Stop mutation which would lead to a truncated non-functional transcript. It should also be mentioned that the screening of 102 Portuguese unrelated health individuals did not reveal a single case harboring any of these mutations.

By adding these three new mutations to the currently known mutational repertoire of *L2HGDH*, the number of disease-associated replacements reaches a total of 35 (Table 2), and 18 of them are listed at the Human Gene Mutation Database (HGMD).<sup>12</sup> The statistical information when all deleterious mutations are taken into account can be summarized as follows: 43% of all mutations (15 out of 35) are amino-acid replacements, 20% (7 out of 35) originate premature stop codons, about 17% (6 out of 35) represent small insertions or deletions (indels), 14% (5 out of 35) replace intronic splicing sequences, and just 6% (2 out of 35) are large deletions but technical difficulties in their detection may be covering a higher fraction.

In the absence of crystal structures for human or other mammalian species, we attempted to infer the relative impact that non-synonymous replacements may have by using a comparative protein-sequence approach. In order to accomplish this, homologous sequences representative of eukaryotic and prokaryotic species were extracted from KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes<sup>13–15</sup>) or NCBI (National Center for Biotechnology Informa-

tion at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) databases and aligned using Genious v4.0<sup>16</sup> (Figure 1). We observed that the 14 disease-associated residues, including the newly Gly211Val, lie in strongly conserved positions. In fact, nine mutations (Gly55Asp, Gly57Arg, Lys81Glu, His98Tyr, Glu176Asp, Tyr195Cys, Gly211Val, Pro302Leu and Ser440-Tyr) replace invariant sites in both eukaryotes and prokaryotes and the remaining five mutations (Ala62Asp, Gly156Val, Ser263Leu, Val296Glu and His434Pro) lie in conserved sites across all eukaryotic species. This observation points to the relevance of these residues to the function of the protein at the same time that raises the possibility that replacements affecting less conserved positions are present in the general population, as they would result in mildly, possibly misidentified, clinical phenotypes.

As mentioned before, mutations shared by different populations are rare. Yet, we are presenting an Italian patient homozygous for the Gly57Arg mutation, which was previously found at heterozygosity state in a Portuguese female (patient 10 in Vilarinho et al.<sup>6</sup>). To distinguish between a common and an independent origin we have used the intragenic polymorphic information.<sup>6</sup> This analysis revealed that both patients share the same haplotypic background in maternally and paternally inherited chromosomes resulting in homozygosity for all the eight single nucleotide polymorphic sites. More specifically, the genetic background correspond to the following genomic sequence coordinates: T<sup>53</sup>(exon 1)-C<sup>159</sup>(exon 2)-A<sup>408+36nt</sup>(intron 3)-A<sup>533</sup>(exon



**Figure 1** Conservation profile of *L2HGDH* sequences across eukaryote and prokaryote species. Residues associated with disease-causing replacements are highlighted. Protein sequences were extracted from KEGG (*Homo sapiens* 79944, *Canis familiaris* 480316 and *Gallus gallus* 423573). The remaining protein sequences were obtained from National Center for Biotechnology Information (NCBI) as follows: *Bos taurus* (AAI51578), *Pongo abelii* (NP\_001125894), *Rattus norvegicus* (NP\_001101498) and *Mus musculus* (NP\_663418), *Synechocystis* sp. (NP\_442886) and *Escherichia coli* (NP\_289209).

4)-C<sup>541-28nt</sup>(intron 4)-T<sup>703+12nt</sup>(intron 5)-G<sup>1196+13nt</sup>(intron 9)-C<sup>1196+34</sup>(intron 9). This strongly suggests that Portuguese and Italian Gly57Arg mutation-carrying chromosomes share a common origin, although extension of the haplotype with additional polymorphic data could increase the degree of confidence in this hypothesis. For the moment, it is noteworthy that a rare mutation, such as Gly57Arg, has been passing through geographically distinct populations, whereas more common ones are still confined to specific population groups.

To conclude, in this report we detail the molecular diagnosis of six new L-2-HGA patients, three of them harboring novel disease-associated mutations (p.Gln197Stop, c.540+1 G>A and p.Gly211Val). To date, the mutational spectrum of the *L2HGDH* gene has revealed 35 distinct mutations and, hopefully, upcoming population surveys will complete this collection for a better understanding of this disease.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

LA (C2007-IPATIMUP/AA1) is supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) Ciência 2007 and by European Social Fund. IPATIMUP is partially supported by 'Programa Operacional Ciência e Inovação 2010' (POCI 2010), VI Programa Quadro (2002–2006).

- 1 Duran, M., Kamerling, J., Bakker, H., van Gennip, A. & Wadman, S. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: an inborn error of metabolism? *J. Inherit. Metab. Dis.* **3**, 109–112 (1980).
- 2 Rzem, R., Veiga-da-Cunha, M., Noel, G., Goffette, S., Nassogne, M. C., Tabarki, B. *et al.* A gene encoding a putative FAD-dependent L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase is mutated in L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 16849–16854 (2004).

- 3 Topçu, M., Jobard, F., Halliez, S., Coskun, T., Yalcinkaya, C., Gerceker, F. O. *et al.* L-2-Hydroxyglutaric aciduria: identification of a mutant gene C14orf160, localized on chromosome 14q22.1. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2803–2811 (2004).
- 4 Rzem, R., Van Schaftingen, E. & Veiga-da-Cunha, M. The gene mutated in L-2-hydroxyglutaric aciduria encodes L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase. *Biochimie* **88**, 113–116 (2006).
- 5 Rzem, R., Vincent, M. F., Van Schaftingen, E. & Veiga-da-Cunha, M. L-2-Hydroxyglutaric aciduria, a defect of metabolite repair. *J. Inherit. Metab. Dis.* **30**, 681–689 (2007).
- 6 Vilarinho, L., Cardoso, M. L., Gaspar, P., Barbot, C., Azevedo, L., Diogo, L. *et al.* Novel L2HGDH mutations in 21 patients with L-2-hydroxyglutaric aciduria of Portuguese origin. *Hum. Mut.* **26**, 395–396 (2005).
- 7 Sass, J. O., Jobard, F., Topçu, M., Mahfoud, A., Werlé, E., Cure, S. *et al.* L-2-Hydroxyglutaric aciduria: identification of ten novel mutations in the L2HGDH gene. *J. Inherit. Metab. Dis.* **105** (2008).
- 8 Larnacout, A., Amouri, R., Kefi, M. & Hentati, F. L-2-Hydroxyglutaric aciduria: clinical and molecular study in three Tunisian families. Identification of a new mutation and inter-familial phenotype variability. *J. Inherit. Metab. Dis.* **4** (2008).
- 9 O'Connor, G., King, M., Salomons, G., Jakobs, C., King, M. & Salomons, G. A novel mutation as a cause of L-2-hydroxyglutaric aciduria. *J. Neurol.* **256**, 672–673 (2009).
- 10 Haliloglu, G., Jobard, F., Oguz, K. K., Anlar, B., Akalan, N., Coskun, T. *et al.* L-2-hydroxyglutaric aciduria and brain tumors in children with mutations in the L2HGDH gene: neuroimaging findings. *Neuropediatrics* **39**, 119–122 (2008).
- 11 Shapiro, M. B. & Senapathy, P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucl. Acids Res.* **15**, 7155–7174 (1987).
- 12 Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A. & Thomas, N. S. T. The human gene mutation database (HGMD): 2003 update. *Hum. Mutat.* **21**, 577–581 (2003).
- 13 Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucl. Acids Res.* **28**, 27–30 (2000).
- 14 Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M. *et al.* KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucl. Acids Res.* **36**, D480–D484 (2008).
- 15 Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K. F., Itoh, M., Kawashima, S. *et al.* From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucl. Acids Res.* **34**, D354–D357 (2006).
- 16 Drummond, A. J., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S. *et al.* at <http://www.geneious.com/> (2008).



# MALATTIA DI GAUCHER

**Michelina Sibilio, Carla Ungaro, Giancarlo Parenti e Generoso Andria\*.**

\*Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Italia

*Qualifica:*

**Michelina Sibilio:** Specialista in Pediatria, Dottoranda di ricerca

**Carla Ungaro:** Laureanda in Medicina e Chirurgia

**Giancarlo Parenti:** Professore associato di Pediatria

**Generoso Andria:** Professore Ordinario di Pediatria, Direttore del Dipartimento Clinico di Pediatria

## INTRODUZIONE

La malattia di Gaucher (GD) è una delle più comuni malattie d'accumulo lisosomiale.

La GD fu descritta per la prima volta dal medico francese Philippe Charles Ernest Gaucher (1854 – 1918). Quando era ancora uno studente, il medico francese descrisse nella sua tesi dottorale del 1882 il caso di una donna con marcata splenomegalia inspiegabile sin dall'infanzia che, successivamente presentò gravi emorragie, anemia e complicanze infettive che la condussero a morte. Venne praticata l'autopsia, che mise in evidenza all'interno della milza insolite cellule di grandi dimensioni, che furono interpretate come cellule epiteliali maligne. Successivamente, furono scoperti gli aspetti metabolici e la natura lipidica del materiale accumulato nelle grandi cellule spleniche anomale.

La malattia fu nominata “Malattia di Gaucher” da Brill nel 1905.

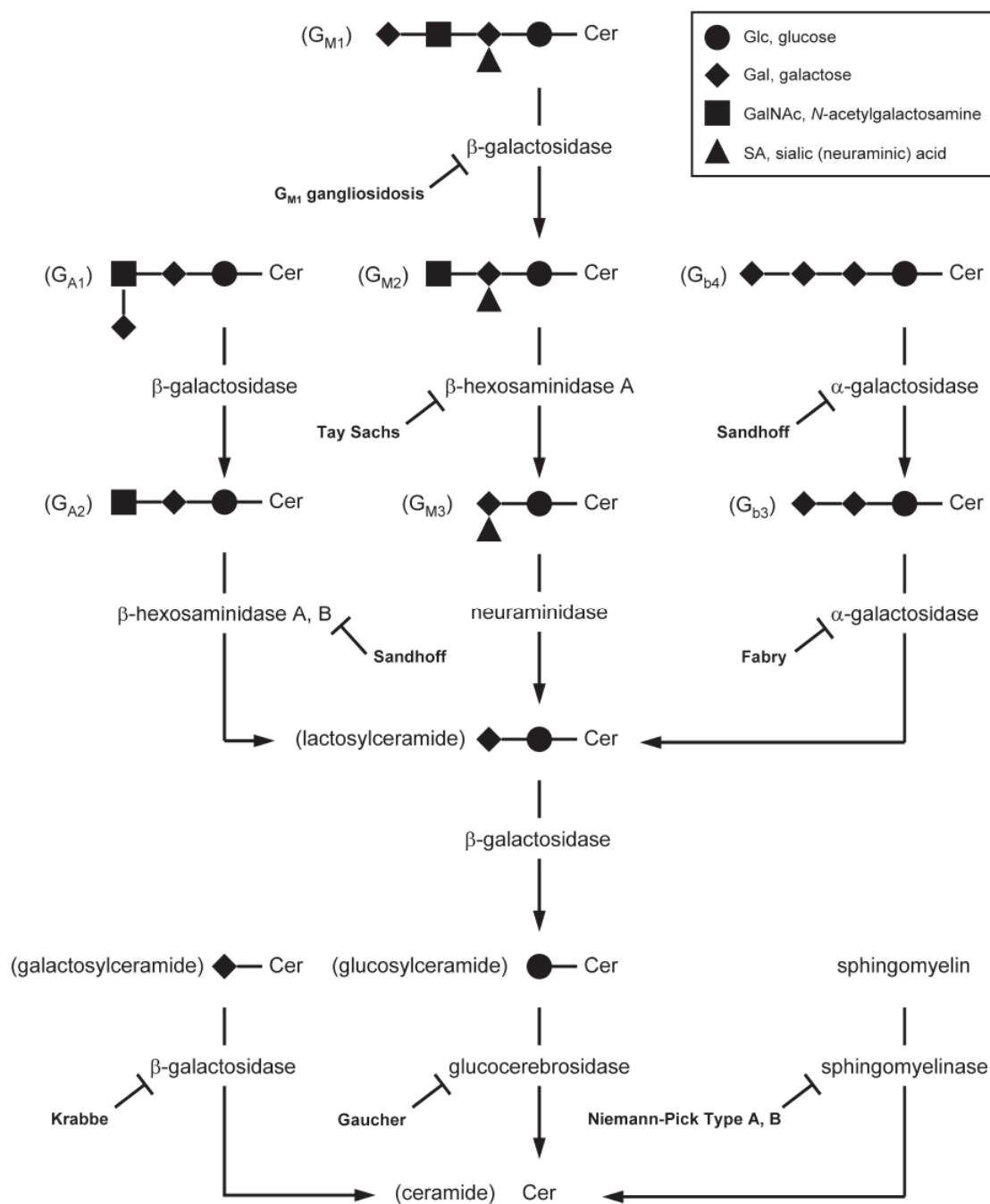
La GD è una malattia panetnica ereditaria trasmessa con modalità autosomica recessiva.

È una malattia multisistemica, caratterizzata dall'accumulo di glucocerebroside (GC), un normale prodotto intermedio del catabolismo dei globosidi e gangliosidi, nei lisosomi delle cellule del sistema reticolo endoteliale (SRE) nei diversi organi e apparati (Desnick RJ 1982; Parkin JL et al 1982). Nel 1965 fu dimostrato da Brady e Patrick il difetto enzimatico alla base di questa malattia, che interessa la  $\beta$  – glucosidasi acida o Glucocerebrosidasi (Brady RO et al 1965; Patrick AD et al 1965). Successivamente Ho e Brien nel 1971, dimostrarono che per l'attività della  $\beta$  – glucosidasi acida era importante la presenza di un “attivatore” a basso peso molecolare, attualmente noto come “Saposina C” (Ho MW et al., 1971).

Nel corso degli ultimi 15 anni la GD è stata oggetto di notevole interesse, poiché è stata la prima malattia da accumulo lisosomiale ad essere trattata con successo mediante terapia enzimatica sostitutiva.

## GENETICA E PATOGENESI

La malattia di Gaucher è una lipidosi multisistemica causata dal deficit di un' idrolasi lisosomiale, la  $\beta$  – glucosidasi acida (o glucocerebrosidasi) (**Fig. 1**), che è codificata da un gene, localizzato sul cromosoma 1(q21-q31) e caratterizzato e sequenziato (Ginns EI et al 1985).



**Fig. 1** *Pathways di degradazione dei glicosfingolipidi: il blocco enzimatico porta all'accumulo del substrato indicato e in grassetto è indicato il rispettivo errore congenito d'accumulo (Da Sawkar AR; 2006, modificata).*

Il gene è lungo circa 7 kb e contiene 11 esoni. Immediatamente più a valle è localizzato uno pseudogene che presenta un alto grado di omologia con il gene funzionante, permettendo così il verificarsi di condizioni ideali per la generazione di mutazioni attraverso eventi di crossover e di conversione genica. Queste mutazioni, che conducono alla formazione di alleli complessi, sono generalmente correlate a manifestazioni fenotipiche più severe.

La  $\beta$  – glucosidasi acida è composta da 497 aminoacidi ed è presente nei lisosomi di tutti i tessuti. La  $\beta$ -glucosidasi acida è una proteina monomerica legata alla membrana lisosomiale (Brady RO et al 1965). Per la degradazione del glucosilceramide (glucocerebroside), la  $\beta$ -glucosidasi acida interagisce con le Saposine (Sap) A e C, che sono, in vitro, modulatori dell'attività enzimatica in presenza di fosfolipidi carichi negativamente. La Sap A non sembra essere un fisiologico attivatore della  $\beta$ -glucosidasi acida, mentre la Sap C interagisce direttamente con l'enzima inducendone un cambio conformazionale che ne permette l'esposizione del sito attivo con successiva scissione del glucosilceramide in glucosio e ceramide, il quale viene poi degradato a sfingosina ed acidi grassi. Entrambi questi attivatori derivano da un singolo gene. Nei tessuti dei pazienti affetti da GD sono stati riscontrati livelli notevolmente elevati delle Saposine A e C.

Il deficit della  $\beta$ -glucosidasi acida determina l'accumulo di substrati lipidici non degradati, in particolare glucosilceramide (glucocerebroside), all'interno dei lisosomi delle cellule di origine monocito - macrofagica.

Questi macrofagi ricchi di lipidi rappresentano la caratteristica patologica della GD. Le cellule di Gaucher hanno un diametro di 20-100  $\mu$ m, e presentano un caratteristico aspetto a carta stropicciata che risulta dalla presenza di inclusioni di substrato intracitoplasmatico. Il citoplasma della cellula di Gaucher reagisce fortemente alla colorazione PAS. Le cellule di Gaucher si distribuiscono dovunque nell'organismo, ma principalmente nella milza, nei sinusoidi epatici, nel midollo osseo e nel parenchima dei linfonodi dove rimpiazzano i normali macrofagi. La presenza di cellule di Gaucher nel midollo osseo e nei campioni di tessuti è altamente suggestiva di GD, per quanto possano essere presenti anche nei pazienti con leucemia granulocitica, mieloma multiplo, morbo di Hodgkin e talassemia (Alterini R et al 1996; Beutler and Grabowski 2001) e nei pazienti con sindrome di immunodeficienza acquisita (AIDS) (Solis OG et al 1986).

Attualmente è noto che le cellule di Gaucher possono stimolare il rilascio di citochine pro-infiammatorie, quali ad esempio le “interleuchine (IL-1, IL-6, IL-10)”, il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ), e il fattore di stimolazione della colonia dei macrofagi (M-CSF). L'IL-6 si ritiene essere collegata alla stimolazione del riassorbimento osseo, a disturbi dell'osteogenesi e all'insorgenza di osteopenia/osteoporosi, segni scheletrici spesso osservati nei soggetti con GD. Inoltre, è stato suggerito che l'IL-6 svolga un ruolo importante nella risposta in fase acuta persistente e nell'aumento del rischio delle anomalie delle immunoglobuline e di tumori ematologici nei pazienti con GD. L'IL-10 probabilmente contribuisce alla malattia perché inibisce l'attività secretoria e la mineralizzazione degli osteoblasti. È stato inoltre riportato in letteratura che l'attivazione degli osteoclasti è associato al rilascio di alcuni enzimi lisosomiali, ed in particolare le catepsine. Tra le varie catepsine, la catepsina K, enzima proteolitico, svolge un ruolo cruciale durante il processo di degradazione della matrice del collagene osseo. Nei pazienti con GD, la catepsina K risulta iper-espressa nella milza, ed è significativamente aumentata nel plasma (Moran MT et al 2000). Pertanto la catepsina K potrebbe essere considerato un valido “attore” nella patogenesi della malattia ossea nella GD.

## MANIFESTAZIONI CLINICHE

La malattia, come definito sopra, è una lipidosi multisistemica caratterizzata dall'accumulo di substrati lipidici non degradati, in particolare il glucosilceramide (glucocerebroside), nelle cellule del sistema reticolo-endoteliale, in particolare il fegato, la milza e il midollo osseo. L'accumulo progressivo di tali substrati determina problemi ematologici e scheletrici, epato-splenomegalia e in alcuni pazienti interessamento neurologico (**TAB 1**). Tra i pazienti affetti da GD è stata osservata un'ampia variabilità nell'ambito delle manifestazioni cliniche e della loro severità (Sidransky E et al 1993). In relazione a tale eterogeneità, sono stati individuati tre fenotipi principali della malattia

(**TAB 2**), distinti in base all'assenza (tipo 1) o alla presenza ed alla severità (tipi 2 e 3) del coinvolgimento del Sistema Nervoso Centrale (SNC):

- tipo 1, non neuronopatico (GD 1)
- tipo 2, neuronopatico acuto (GD 2)
- tipo 3, neuronopatico cronico o di Noorbotten (GD 3)

La forma più comune della malattia di **Gaucher è il tipo 1**, contando circa il 99% dei casi.

Le stime relative all'incidenza e alla prevalenza della GD 1 sono ampiamente variabili. Si stima che la frequenza di questa forma si aggiri intorno ad 1:40000 – 1: 60000 nella popolazione generale, mentre è molto diffusa tra gli Ebrei Ashkenaziti, dove è presente un tasso di 1:400 – 1:600.

L'età di insorgenza varia dall'infanzia precoce alla tarda età adulta, sebbene l'esordio in età adulta sia comune. La maggior parte dei pazienti sintomatici presenta l'esordio prima dei 10 anni di età (Charrow J et al 2000). Caratteristica principale della GD 1 è l'assenza di interessamento del SNC, tuttavia in questo stesso tipo sono stati descritti sintomi neurologici secondari all'interessamento osseo (emboli grassi, compressione midollare) o a coagulopatie (ematomelia, neuropatie, plessopatie, ictus). Sono stati descritti in pazienti con GD 1 casi di neuropatia periferica (primaria) e in diversi pazienti si è assistito allo sviluppo di una sindrome parkinsoniana atipica. L'espressione clinica è notevolmente variabile: si va, infatti, da pazienti completamente asintomatici a pazienti con massiva epatosplenomegalia, compromissione della funzionalità epatica, piastrinopenia e grave interessamento osseo. Le manifestazioni cliniche più frequenti della malattia di Gaucher non-neuronopatica sono la splenomegalia con anemia e trombocitopenia (principalmente secondaria all'ipersplenismo), epatomegalia, malattia ossea (Beutler e et al 2001). Inizialmente i pazienti possono presentare facilità al sanguinamento, secondaria alla trombocitopenia, affaticamento cronico legato all'anemia, epatomegalia con o senza alterazione degli indici di funzionalità epatica, splenomegalia e osteoalgie. Alcuni pazienti possono presentare coinvolgimento polmonare (insufficienza polmonare, ipertensione polmonare), al momento dell'esordio clinico. Altri pazienti possono essere scoperti durante una valutazione per altre patologie o durante esami di routine. Nei pazienti sintomatici la splenomegalia è progressiva e può divenire massiva. Clinicamente il coinvolgimento osseo manifesto, che è espressione dell'infiltrazione del midollo da parte delle cellule di Gaucher, compare in quasi tutti i pazienti affetti (Charrow J et al 2000) ed è caratterizzato da osteopenia, osteonecrosi (necrosi avascolare), ostesclerosi, episodi acuti di dolore straziante (crisi ossee), dolore osseo cronico, fratture patologiche (in particolare a livello del femore, dell'omero, delle coste e della pelvi) e deformità scheletriche (Stowens DW et al 1985; Mankin HJ et al 1990; Pastores GM et al 1995; Beutler e et al 2001). In particolare è noto che l'interessamento del sistema scheletrico non è uniforme, ma caratteristicamente procede attraverso diversi stadi. Il primo stadio è rappresentato dall'osteoporosi che è la manifestazione più frequente nonché la maggiore fonte di complicazioni nei pazienti con tipo 1. Gli stadi successivi portano alla progressiva distruzione dell'osso, delle articolazioni e delle cavità midollari (**TAB 3**). Più della metà dei pazienti presenta un'evidenza radiologica di coinvolgimento scheletrico, inclusa la forma a "fiasca" di Erlenmeyer della parte distale dei femori, causata da problemi di rimodellamento nei primi anni dell'infanzia. L'osteonecrosi, che molto spesso colpisce la testa del femore, è probabilmente la manifestazione scheletrica più significativa e invalidante e potenzialmente irreversibile per i pazienti affetti (specie per i bambini) da GD non-neuronopatica (Katz K et al 1996; Ida H et al 1999; Wenstrup RJ et al 2002). Le crisi ossee rappresentano un aspetto molto importante della GD, e molte volte hanno un impatto davvero deleterio sulla qualità di vita dei pazienti affetti. Le "crisi ossee" sono caratterizzate da episodi di dolore osseo acuto ed invalidanti accompagnati da febbre alta, sudorazione, e segni locali di infiammazione. L'incidenza delle crisi ossee tende a diminuire con l'età, tuttavia non è noto il perché questo accada.

I bambini con GD non-neuronopatica possono presentare anche alterazioni del sistema endocrino quali: ritardo di crescita e della maturazione scheletrica e/o ritardo della pubertà (Bembi B et al 2002; Kaplan P et al 1996; Kauli R et al 2000).

Nel 2004 un gruppo di esperti internazionali si sono riuniti per poter valutare lo stato dell'arte della GD non-neuronopatica in età pediatrica (Gregory A et al 2004; Baldellou A et al 2004, Pastores GM et al 2004), alle cui raccomandazioni si rimanda.

**La GD 2**, rappresenta la forma infantile neuronopatica della malattia. È molto meno frequente e non presenta una stretta predilezione etnica. La frequenza stimata per tale forma è inferiore a 1: 100.000 nati. La maggior parte dei bambini affetti generalmente va incontro a morte entro i primi due anni di vita, principalmente a causa di polmoniti da aspirazione e crisi di apnea. La GD 2 è caratterizzata da un decorso neurodegenerativo rapido ed un esteso coinvolgimento viscerale. Recentemente è stata identificata una variante ancor più severa di tale forma associata ad artrogriposi, ittiosi congenita, morte neuronale e conseguente morte in età neonatale (Fujimoto A et al 1995).

**La GD 3**, fu descritta per la prima volta da Hillborg nel 1959, da lui soprannominata "Noorbotthian", in quanto molto frequente nella popolazione Noorbotthiana della Svezia, ove l'incidenza è di 1: 50.000. La GD 3 è una forma rara, presentando una frequenza di 1 : 50.000 – 1 : 100.000 nati. Generalmente si manifesta nell'infanzia con segni clinici di grado intermedio rispetto a quelli del tipo 1 e 2 e conduce a morte tra la seconda e la quarta decade di vita. È presente un coinvolgimento neurologico che, rispetto al tipo 2, si manifesta più tardivamente e con minore severità. La GD 3 è ulteriormente suddivisa in tre sottotipi (3a, 3b, 3c) sulla base dell'interessamento neurologico (**TAB 2**): GD 3a è caratterizzata da un progressivo coinvolgimento neurologico caratterizzato principalmente da miotonia e demenza (Patterson MC et al., 1993), nella GD 3b è presente un marcato interessamento viscerale e scheletrico, ma le manifestazioni neurologiche sono limitate alla presenza della paralisi orizzontale sopranucleare dello sguardo caratterizzata dal rallentamento dei movimenti oculari saccadici orizzontali coniugati, infine i pazienti con GD 3c presentano paralisi orizzontale sopranucleare isolata dello sguardo, opacità corneale, calcificazioni delle valvole cardiache, ma generalmente presentano una minore compromissione viscerale.

Tuttavia, all'interno di ciascun tipo ed anche nell'ambito di uno stesso gruppo etnico e/o demografico, sia il fenotipo che il genotipo possono risultare molto eterogenei.

### **Altre manifestazioni:**

Anche se solo raramente, in alcuni pazienti affetti da GD è stata descritta la presenza di **coinvolgimento cardiaco**, soprattutto a carico del pericardio e del miocardio. Tuttavia sono state descritte anche altre manifestazioni a carico del cuore, quali l'ispessimento delle valvole del cuore sinistro, calcificazioni dell'aorta, delle valvole aortiche e mitrali, con conseguente stenosi aortica e mitrale (Abrahamov A et al 1995). **Un'altra complicanza osservata nei pazienti con GD è il coinvolgimento polmonare.** La patogenesi delle manifestazioni polmonari non è chiaramente nota, tuttavia come descritto per gli altri organi, l'infiltrazione delle cellule di Gaucher nel tessuto interstiziale dei polmoni può portare a morte delle cellule e una reazione fibrotica circostante a causa del rilascio di citochine pro-infiammatorie. Dal punto di vista clinico, il coinvolgimento polmonare può manifestarsi con dispnea (da sforzo), tachipnea e tosse (espressione di malattia restrittiva dei polmoni secondario alla fibrosi polmonare), mentre la limitazione delle escursioni diaframmatiche dovuta alla visceromegalia può contribuire alla sintomatologia polmonare. Una delle complicanze molto severe della malattia polmonare è l'ipertensione polmonare, specie nei pazienti adulti, secondaria ad una varietà di cause, sia polmonari (obliterazione dei capillari alveolari da parte delle cellule di Gaucher o infiltrazione del parenchima polmonare) che extra-polmonari. I primi sintomi clinici di ipertensione polmonare possono comprendere dispnea da sforzo e sincope, e nei pazienti con malattia più avanzata e di lunga durata sono dispnea a riposo, cianosi e ippocratismo digitale. Alterazioni della funzionalità polmonare sono comuni, specie nel tipo 1, e consistono in ostruzioni delle vie aeree con diminuzione dei flussi espiratori, riduzione dei volumi polmonari ed anormalità della diffusione alveolo-capillare. Tali alterazioni non sono correlate né con il genotipo né con l'età del paziente (Kerem E et al 1996). Per valutare

l'interessamento polmonare e la sua evoluzione nel tempo nell'ambito della GD le indagini consigliate sono: 1) radiografia del torace in posizione antero-posteriore e latero-laterale utile per la rilevazione di infiltrati reticolari o reticolonodulari bilaterali o di segni che possono suggerire la presenza di ipertensione polmonare; 2) TC ad alta risoluzione (HRCT), indagine molto sensibile per il rilevamento di ispessimento interlobulare, intralobulare, peribronchiale e le opacità a vetro smerigliato; 3) test di funzionalità polmonare (PFT); 4) lavaggio bronco-alveolare (BAL). **Inoltre nei pazienti affetti da GD è stato riscontrato la presenza di interessamento del sistema gastrointestinale**, correlato principalmente alla importante organomegalia e caratterizzato da sensazione di pienezza e di precoce sazietà. Sono stati segnalati in letteratura anche episodi di sanguinamento da varici esofagee e frequenti episodi di diarrea. Altri organi bersaglio della GD sono i linfonodi, comunemente interessati, in particolare quelli nel collo, nell'inguine, e a livello del cavo ascellare. Possono essere ugualmente interessati il timo, le placche di Peyer, le adenoidi e le tonsille. Raramente, sono state descritte manifestazioni a carico dei reni quali la sclerosi glomerulare secondaria e progressiva insufficienza renale con proteinuria. Infine in diversi pazienti affetti da GD tipo 1 sono state riscontrate alterazioni dell'aggregazione piastrinica, una riduzione di alcuni fattori della coagulazione (IX, XII, VII, X, VIII, II), di alcuni inibitori naturali (la proteina C, la proteina S e l'Antitrombina III) ed aumentati livelli di anticorpi anti-cardiolipina ed attività anticoagulante lupica. È stato inoltre riscontrato che i pazienti con GD 1 presentano un aumentato rischio di sviluppare patologie tumorali, sia di tipo ematologico (linfoma, mieloma multiplo etc) che di tipo solido (carcinoma epatocellulare) (de Fost M et al., 2006).

## MARKER BIOCHIMICI

Nei pazienti con GD sono stati identificati alcuni marker biochimici della malattia e alcune anomalie biochimiche con relazione al coinvolgimento osseo o viscerale. Tali marcatori si sono dimostrati utili (*seppure con dei limiti*) per il monitoraggio della progressione della malattia e dell'efficacia terapeutica. Questi marker comprendono:

- chitotriosidasi
- $\beta$  - esosaminidasi
- l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE)
- fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP)

Tra questi marcatori, il più utilizzato per il monitoraggio della GD è la chitotriosidasi. La chitotriosidasi (chitinasi) è secreta in eccesso dai macrofagi attivati carichi di lipidi; nei pazienti affetti da GD i livelli plasmatici di chitotriosidasi sono significativamente elevati. Tuttavia, l'utilità e la sensibilità come marker surrogato della malattia è resa difficile dal fatto che in una piccola percentuale dei pazienti (variabile tra il 6 e il 8%) non presenta alcuna attività della chitotriosidasi, perché nel gene della chitotriosidasi porta un allele nullo (Boot RG et al., 1998). Nei pazienti con GD, i livelli assoluti di chitotriosidasi non sono correlati né con l'età, né con la presenza/assenza di splenectomia o gravità del fenotipo clinico, tuttavia i valori più alti sono stati osservati in pazienti in età pediatrica e nei soggetti con gravi alterazioni scheletriche (Barone et al. 2000). Inoltre i livelli plasmatici di chitotriosidasi non correlano con i valori delle transaminasi sieriche, né con i livelli di fosfatasi acida e ferritina nel siero. Infine, la chitotriosidasi è stata valutata periodicamente nei soggetti sottoposti a terapia enzimatica sostitutiva (ERT): in tutti è stato osservato un graduale decremento dei livelli di chitotriosidasi plasmatici sin dal primo mese di terapia, con riduzione percentuale media del 53% (range 47 – 70%) dopo il primo anno di terapia (Barone R et al 2000; Giraldo P et al 2001; Vellodi A et al 2005). In tutti i pazienti esaminati, la graduale diminuzione della chitotriosidasi coincideva con una risposta soddisfacente alla terapia enzimatica sostitutiva, includente il miglioramento delle condizioni generali, e dello sviluppo staturo-ponderale in età pediatrica, l'aumento graduale dell'emoglobina (> 2 – 3 g/dl dopo 12 mesi) e delle piastrine (> 25.000 – 50.000/ml dopo 12 mesi) e la progressiva riduzione della visceromegalia. Il grado di riduzione della chitotriosidasi non è correlato all'età del paziente né alla gravità del fenotipo clinico.



Resta difficile da comprendere il ruolo della TRAP e dell'ACE nel monitoraggio della GD, e il loro impiego nella pratica clinica è limitato.

Altri marker biochimici possibilmente utili comprendono la proteina associata alla membrana lisosomiale (LAMP), il CD163 solubile e la chemochina CCL18/PARC; tuttavia la loro applicabilità nella pratica clinica è al momento oggetto di studio.

Infine resta poco chiara, l'utilità della transcobalamina e della ferritina (entrambe aumentate nella GD) come indicatore di cellule di accumulo.

## DIAGNOSI

La GD dovrebbe essere considerata nella *diagnosi differenziale* dei pazienti con inspiegabile anemia cronica, piastrinopenia, organomegalia, diatesi emorragica, osteoalgie o una combinazione di tali elementi, con o senza la presenza di segni di interessamento del sistema nervoso centrale. Tuttavia, accade piuttosto spesso che tra la prima insorgenza dei sintomi e la diagnosi intercorra uno spazio temporale notevole. Gli errori diagnostici iniziali più comuni variano dai comuni dolori della crescita o frattura accidentale oppure epistassi ricorrente a causa di disturbi emorragici non specifici con splenomegalia, leucemia o Malattia di Legg-Calvè-Perthes.

I dati del Registro Gaucher per l'Europa occidentale hanno mostrato che poco più della metà dei pazienti reclutati ha ricevuto la diagnosi corretta prima dei 16 anni (**TAB 4**) (Charrow J et al 2000).

Il riscontro di dati di laboratorio quali anemia, piastrinopenia e, soprattutto, l'aumento della fosfatasi acida non prostatica (ACP o TRAP, isoenzima 5) risulta essere suggestivo per la GD (**TAB 5**). Inoltre, nella GD è possibile riscontrare una diminuzione dei valori di colesterolo (per aumentato catabolismo delle lipoproteine da parte dei macrofagi attivati), un aumento della ferritina, un aumento dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), un aumento del glucosilceramide e della chitotriosidasi.

L'esame del midollo osseo mostra, usualmente, la presenza delle cellule di Gaucher. Il metodo più efficiente ed affidabile per la conferma diagnostica di GD si basa sulla determinazione dell'attività della  $\beta$ -glucosidasi acida ( $\beta$ -glucocerebrosidasi), eseguibile su **leucociti** isolati da sangue periferico (leucociti del sangue periferico, presentano un'abbondante attività della  $\beta$ -glucocerebrosidasi), su **fibroblasti** nonché **amniociti** o **villi coriali** per la diagnosi prenatale. In generale, i pazienti affetti da GD presentano un'attività enzimatica che varia tra il 10 e il 30 % dell'attività normale (Brady et al 1965; Beutler E et al 1990). In media, i leucociti ed i fibroblasti cutanei degli eterozigoti per la GD mostrano livelli di attività che si sovrappongono a quelli della popolazione normale (Beutler E et al 1971). Non esiste una correlazione tra l'attività enzimatica misurata e la gravità della malattia (Grabowski GA et al 1996). Si completa il percorso diagnostico con l'analisi molecolare per l'identificazione di mutazioni.

Al momento, oltre 300 mutazioni (missense, nonsense, giunzione di splicing, inserzioni, delezioni) sono state identificate nel gene della glucocerebrosidasi umana (Koprivica V et al. 2000).

Posta la diagnosi di GD è importante, per un corretta valutazione basale, raccogliere una dettagliata storia medica del paziente, e nel caso dei pazienti pediatrici, valutare correttamente lo sviluppo del bambino, la funzione sociale e la performance scolastica. Inoltre un altro dato molto importante per un accuratezza diagnostica è l'anamnesi familiare (etnia, consanguineità, presenza di sintomi o segni correlati alla GD nei genitori, fratelli o altri parenti).

Particolare attenzione deve essere posta per la diagnosi della malattia di Gaucher tipo 3, date le implicazioni terapeutiche specifiche che questa comporta: si dovrebbe sospettare la GD quando i sintomi clinici di una malattia viscerale aggressiva sono appena all'inizio, oppure in presenza di un quoziente intellettivo in diminuzione. Per la diagnosi è fondamentale la valutazione dei movimenti oculari e l'esecuzione di indagini elettrofisiologiche (Potenziali Evocati), che permettono di rilevare alterazioni subcliniche del SNC, oltre agli esami clinici, alle misure audiologiche neuropsicometriche e di diagnostica per immagini (Risonanza Magnetica Nucleare – RMN, Tomografia computerizzata – TC e Tomografia ad emissione di singolo fotone - SPECT).

## **CORRELAZIONE GENOTIPO – FENOTIPO**

Grazie all'identificazione del gene della  $\beta$ -glucocerebrosidasi è stato possibile effettuare una caratterizzazione molecolare dei pazienti con GD. Sino ad oggi, più di 300 mutazioni sono state identificate a carico del gene della  $\beta$ -glucocerebrosidasi (Koprivica VV et al., 2000), includenti mutazioni puntiformi, crossovers e ricombinazioni, ma previsioni sul decorso clinico sulla base del genotipo possono essere solo sommarie. La maggior parte delle mutazioni descritte come causa della GD sono mutazioni missense, che determinano la formazione di una  $\beta$ -glucosidasi acida con ridotta funzione catalitica e/o stabilità.

Sebbene alcune correlazioni siano state trovate tra genotipo e fenotipo (Zimran A et al 1989; Sibille A 1993), attualmente è noto che l'analisi delle mutazioni ha un valore molto limitato per poter esprimere un giudizio sulla prognosi della malattia.

Infatti è stato osservato che i pazienti portatori delle stesse mutazioni genetiche, quali ad es. quelli che appartengono alla stessa famiglia o persino i gemelli, possono mostrare ad un certo punto della loro vita un'ampia varietà nelle manifestazioni (intrafamiliari) della malattia. Questo rafforza la teoria secondo cui fattori diversi dal genotipo, come da es. fattori epigenetici e/o fattori ambientali contribuiscano all'espressione fenotipica.

Quattro mutazioni (N370S, L444P, 84GG e IVS-2) coprono il 90-95% degli alleli mutanti degli Ebrei Ashkenaziti (Barranger JA et al 1995) ed in ogni caso rappresentano le mutazioni più frequenti anche in popolazioni non ebreo.

In generale, i pazienti affetti da GD tipo 1 omozigoti per la mutazione N370S tendono ad avere un esordio più tardivo e un decorso più lento rispetto ai pazienti con una copia di N370S e un altro allele comune (Sibille A et al 1993; Theophilus B et al 1989) (**TAB 6**). Altre mutazioni (es. L444P e 84GG) sono invece associate al rischio di manifestazioni più severe e interessamento neurologico (GD tipo 2 e 3). A tal proposito, è noto che lo stato omozigote per la L444P generalmente anticipa la malattia neuronopatica cronica.

## **DIAGNOSI PRENATALE**

La diagnosi prenatale è possibile attraverso la determinazione dell'attività enzimatica nei villi coriali o negli amniociti coltivati (Barranger JA et al 1995). È anche possibile attraverso la ricerca nel feto di eventuali mutazioni già identificate nella famiglia.

## **TERAPIA**

Negli ultimi 15 anni grandi progressi sono stati effettuati per il trattamento della GD al fine di migliorare la qualità di vita, la crescita e lo sviluppo dei pazienti affetti. Ancora oggi, un ruolo fondamentale nella gestione di tali pazienti è giocato dalla terapia di supporto, cui si è aggiunta, ormai da oltre un decennio, la terapia enzimatica sostitutiva (ERT). La GD è stata, infatti, la prima malattia metabolica che ha beneficiato di un trattamento che mirasse alla correzione della via metabolica alterata.

Tuttavia, diverse strategie terapeutiche innovative, quali il trapianto di midollo osseo o il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) e la riduzione del substrato (SRT) sono state introdotte e sperimentate nei pazienti affetti, con risultati incoraggianti. Alcune di tali tecniche, in particolare il HSCT e la ERT tendono ad aumentare la disponibilità dell'enzima lisosomiale deficitario. Un approccio alternativo è basato sulla deprivazione del substrato (SRT), attraverso l'impiego di iminozuccheri che sono in grado di inibire la sintesi del substrato.

Per tutte queste strategie la GD è stata la malattia lisosomiale più ampiamente studiata.

## **Terapia di supporto**

Il trattamento è innanzitutto sintomatico, con trasfusioni di sangue in caso di anemia, parziale o totale di splenectomia in caso di severa compromissione meccanica del polmone o ipersplenismo, analgesici (antinfiammatori non steroidei, acetaminofene) per le osteoalgie, e procedure ortopediche di posizionamento di protesi articolari nei pazienti con severo coinvolgimento osseo. Le severe crisi ossee possono essere prontamente trattate con la somministrazione di glucocorticoidi (prednisolone).

## **Trapianto di midollo osseo (HSCT)**

Poiché le manifestazioni primarie della GD sono dovute all'interessamento delle cellule del SRE, il trapianto di midollo osseo rappresenta una strategia terapeutica potenzialmente curativa.

HSCT ha lo scopo di rimpiazzare le cellule ematopoietiche del paziente ricevente con le cellule wild-type del donatore, secernenti l'enzima normale. Un punto cruciale riguarda l'efficacia del HSCT nel prevenire la progressione del coinvolgimento neurologico. A tal proposito, è stato notato che le cellule della microglia derivate dal donatore sono presenti nel cervello del ricevente; tuttavia rimane ancora in discussione se queste cellule siano in grado di liberare una quota sufficiente di enzima funzionale per le cellule del sistema nervoso centrale. Attualmente è consigliabile che il HSCT venga effettuato precocemente, in particolare prima che si verifichi un grave coinvolgimento neurologico.

L'HSCT è risultato efficace per il trattamento della GD tipo 1, determinando la correzione del difetto enzimatico e il miglioramento delle manifestazioni della malattia (Malatack et al. 2003).

L'efficacia dell'HSCT nella GD tipo 2 e 3 (forme neuronopatiche) è limitata.

Nella GD tipo 2, il HSCT migliora il coinvolgimento a carico del sistema nervoso periferico, mentre la progressione del danno a carico del sistema nervoso centrale risulta immodificata.

Nella GD tipo 3, con il HSCT è stata osservata una stabilizzazione delle manifestazioni a carico del sistema nervoso centrale.

## **Terapia enzimatica sostitutiva (ERT)**

La GD è stata la prima malattia d'accumulo ad essere trattata con ERT. La ERT è basata sull'infusione endovenosa periodica dell'enzima lisomiale ricombinante wild-type. L'enzima successivamente viene internalizzata dalle cellule del paziente e indirizzata, attraverso la via del mannosio-6-fosfato, verso i lisosomi dove esercita la sua attività catalitica. Tale approccio è risultato efficace nei pazienti con GD non-neuronopatica determinando un miglioramento dei parametri ematologici e biochimici, della crescita e dell'epatosplenomegalia. Inoltre evidenze cliniche e radiologiche hanno mostrato che la ERT è in grado di migliorare le manifestazioni a carico del sistema scheletrico e la qualità di vita dei pazienti. Tuttavia poiché l'enzima somministrato non è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica, l'efficacia di questo approccio nelle forme di GD neuronopatiche è molto ridotta (Andria G et al., 2003; 2006).

Nel 1991 negli USA, fu approvato dalla Food and Drug Administration, l'utilizzo clinico dell'Alglucerasi (Ceredase<sup>TM</sup>, Genzyme corporation, Boston), per la terapia enzimatica sostitutiva nella GD. Il principio attivo di questo farmaco era la  $\beta$ -glucocerebrosidasi estratta e purificata da placenta umana e modificata nella componente oligosaccaridica in modo da essere indirizzata nelle cellule del sistema reticolo-istiocitario.

È stato dimostrato che la terapia enzimatica sostitutiva con  $\beta$ -glucocerebrosidasi placentare purificata è sicura ed efficace. Successivamente è stata anche prodotta una forma ricombinante dell'enzima (Imiglucerasi), che ha confermato gli stessi risultati clinici della forma placentare (Grabowski et al 1995). La disponibilità di enzima ricombinante rende possibile una produzione

illimitata e l'eliminazione del rischio di trasferire patogeni umani con la somministrazione di enzima umano purificato.

Nel 1994 l'imiglucerasi (Cerezyme<sup>®</sup>, **Genzyme Corporation, Cambridge, MA**), è stato approvato negli USA per la commercializzazione per il trattamento della GD di tipo 1, e nel 1997 ha ricevuto parere favorevole per la commercializzazione anche nell'Unione Europea. Attualmente nell'Unione Europea, Cerezyme è al momento indicato per l'uso come terapia enzimatica sostitutiva a lungo termine nei pazienti con diagnosi confermata di GD non solo non neuronopatica (Tipo 1) ma anche neuronopatica cronica (Tipo 3), che mostrano dal punto di vista clinico manifestazioni non neurologiche significative. La ERT con imiglucerasi (Cerezyme) rappresenta il gold standard per il trattamento della GD.

Attualmente è noto che il medico referente per la GD deve personalizzare il trattamento con ERT in base alle esigenze, al decorso della malattia e alle risposte terapeutiche specifiche dei singoli pazienti (**TAB 7**). Tutti i bambini con segni fisici o manifestazioni della GD devono essere trattati con ERT. In linea generale, dopo 6 mesi di trattamento con dosaggio appropriato, tutti i pazienti rispondono alla terapia enzimatica sostitutiva con miglioramento dei parametri ematologici, biochimici e viscerali (Barton et al 1991; Grabowski et al 1995; Zimran et al 1994); tuttavia in assenza di miglioramento occorre valutare l'opportunità di aumentare la dose. In particolare, se le crisi ossee diventano persistenti e invalidanti è consigliabile aumentare la dose del 50%.

In generale, è stato osservato che una risposta inadeguata non deriva da un dosaggio sbagliato, bensì da caratteristiche soggettive non superabili da un aumento della dose.

## **Obiettivi della terapia con ERT**

*Sulla base dell'analisi di tutti i dati disponibili sono stati proposti una serie di obiettivi terapeutici come guida per i clinici che hanno in cura i pazienti (inclusi i pazienti pediatrici) con Gaucher tipo 1. Nel 2003 un gruppo internazionale di esperti sulla GD tipo 1 con ampia esperienza clinica nel trattamento dei pazienti con questa patologia, per ciascuno dei sistemi coinvolti dalla malattia, in particolare per quanto riguarda l'anemia, la trombocitopenia, l'epatomegalia, la splenomegalia, la malattia ossea, la crescita, le condizioni polmonari e la qualità di vita hanno stabilito obiettivi specifici, insieme ai tempi previsti per il raggiungimento di tali obiettivi (**TAB 8**) (Pastores GM et al 2004, Baldellou A et al 2004; Weinreb NJ et al 2004).*

Tutti i bambini che vengono sottoposti a terapia enzimatica sostitutiva devono essere attentamente e regolarmente monitorati, per valutare anche la opportunità di modificare la dose, nel caso in cui non siano stati raggiunti gli obiettivi terapeutici pianificati entro il periodo di tempo stabilito. In generale il miglioramento dell'organomegalia, dei parametri ematologici e biochimici si verifica entro i primi 6 mesi di trattamento.

È bene sempre ricordare che le risposte alla terapia nei singoli pazienti sono altamente variabili, anche nei pazienti con fenotipi identici; pertanto è molto importante che l'approccio terapeutico sia personalizzato.

## **Sintomi ematologici**

Gli obiettivi terapeutici con Cerezyme sono quelli di aumentare l'emoglobina almeno a livelli normali bassi, eliminare la necessità di trasfusioni e ridurre i sintomi associati all'anemia (dispnea, angina, etc). In generale i parametri ematologici sono i più sensibili e precoci indicatori di risposta alla ERT (Pastores GM et al 1993; Pastores GM et al 2004).

Per quanto riguarda la piastrinopenia, il raggiungimento del goal terapeutico (aumento della conta piastrinica per prevenire complicanze emorragiche), dipende dalle condizioni basali della milza,

dalla severità della splenomegalia e dai livelli della conta piastrinica prima dell'inizio del trattamento con ERT.

Nei pazienti splenectomizzati, la conta piastrinica dovrebbe normalizzarsi nel corso del primo anno di trattamento. Mentre nei pazienti con milza intatta e con moderata piastrinopenia ( $> 60.000\mu\text{L}$  ma  $< 120.000\mu\text{L}$ ), la conta delle piastrine dovrebbe aumentare da 1.5 a 2 volte durante il primo anno di trattamento fino ad arrivare a valori normali-bassi dopo 2 anni di trattamento.

Se la conta piastrinica, prima dell'inizio della ERT è severa ( $< 60.000\mu\text{L}$ ), sono da attendersi negli anni continui aumenti dei valori, ma la normalizzazione di tale parametro risulta difficile (Pastores GM et al 2004).

## **Sintomi viscerali**

Gli obiettivi terapeutici comprendono una riduzione del volume epatico e splenico e il miglioramento della sintomatologia dolorosa secondaria a gonfiore addominale e infarto viscerale. Generalmente, il volume del fegato e della milza si modifica molto precocemente e tale parametro rappresenta un indicatore molto sensibile e accurato di risposta alla terapia enzimatica sostitutiva. Nei pazienti con splenomegalia, lo scopo della ERT è quello di cercare di ridurre le complicanze secondarie all'aumento del volume splenico (dolore addominale, sazietà precoce), migliorare il dolore addominale secondario ad episodi di infarto splenico e infine eliminare la condizione di ipersplenismo (Pastores GM et al 2004). Nei pazienti con severa epato-splenomegalia, la normalizzazione del volume epatico e splenico risulta molto difficile.

Nei bambini che ricevono la terapia enzimatica sostitutiva, la metodica più affidabile per la valutazione del volume del fegato e della milza è la Risonanza Magnetica Nucleare (MRI) (Hill Sc et al 1992). Come indicato da Baldellou et al. 2004, per il follow-up dei pazienti sottoposti a terapia enzimatica sostitutiva, si raccomanda di effettuare la MRI addome ogni 12 mesi fino al raggiungimento del goal terapeutico, e successivamente ogni 24 mesi (**TAB 9**). Tuttavia, qualora non fosse possibile effettuare la MRI addome, per il monitoraggio della volumetria degli organi ipocondriaci è possibile effettuare un esame ultrasonografico tridimensionale ogni 6 mesi. Un'altra metodica che potrebbe essere utilizzata per la valutazione delle dimensioni del fegato e della milza è la tomografia computerizzata (TC) dell'addome. Tuttavia, è da segnalare che l'effettuazione di questa tecnica espone i pazienti ad una grande quantità di radiazioni e pertanto non può essere effettuata ripetutamente nei bambini.

## **Sintomi scheletrici**

Il coinvolgimento scheletrico è presente in quasi tutti i pazienti affetti (Charrow J et al 2000). Un attento monitoraggio clinico del sistema scheletrico è fondamentale per i pazienti affetti da GD. L'obiettivo principale della terapia con ERT è quello di prevenire la comparsa di complicanze scheletriche (osteonecrosi, fratture e lesioni litiche), cercare di migliorare e/o prevenire la comparsa di dolore osseo (sia acuto che cronico), prevenire le crisi ossee e migliorare la densità minerale ossea (BMD) almeno entro 1 o 2 anni di trattamento enzimatico sostitutivo. Il coinvolgimento scheletrico nella GD è generalmente progressivo, pertanto la ERT dovrebbe essere iniziata appena possibile per prevenire la evoluzione del danno scheletrico o la comparsa di complicanze scheletriche irreversibili (Charrow J et al 2007). Per una corretta valutazione del compartimento osseo, ancora una volta la Risonanza Magnetica Nucleare (MRI) risulta essere la metodica più affidabile e più indicata, poiché dotata di alta sensibilità (Vom Dahl S et al 2006). La MRI, infatti, è in grado di fornire una valutazione qualitativa dell'infiltrazione del midollo osseo ed è in grado di rilevare infarto, fratture e necrosi avascolari, note complicanze della GD. Idealmente, la MRI dovrebbe essere effettuata prima dell'inizio della ERT, e successivamente, dopo aver raggiunto l'obiettivo terapeutico, ogni 12 o 24 mesi (**TAB 9**). La MRI inoltre dovrebbe essere praticata prima che venga effettuata una riduzione del dosaggio della terapia enzimatica e dopo ogni cambiamento della dose. Inoltre, la MRI trova indicazione per tutte quelle circostanze in cui si ha la comparsa di

sintomatologia d'allarme, quale dolore osseo. Nei bambini più piccoli (< 7 anni), per evitare artefatti da movimento, per l'esecuzione della MRI potrebbe essere necessario sedare o addirittura anestetizzare il bambino. La radiografia standard dello scheletro potrebbe essere utilizzata per il monitoraggio di complicanze ortopediche (es. frattura) o per il rilevamento di lesioni focali quali la necrosi avascolare o per individuare la deformità a fiasca di Erlenmeyer. I vantaggi di tale tecnica sono sicuramente quelli di essere poco costosa e ampiamente disponibile. Tuttavia tale metodica da sola non può essere utilizzata per il monitoraggio della risposta dello scheletro alla terapia enzimatica, in quanto non è in grado di rilevare molte delle manifestazioni scheletriche associate alla GD, ma dovrebbe essere indicata solo in aggiunta alla MRI. Si stima infatti che la sensibilità della radiografia standard nel definire la presenza di coinvolgimento scheletrico si aggiri solo intorno al 30-40% (Maas M et al 2002). Infine, per la valutazione della densità minerale ossea della testa del femore e della colonna vertebrale, e per la identificazione di pazienti ad alto rischio di fratture patologiche, la DEXA (dual-energy X-ray absorptiometry – assorbiometria radiografica ad energia combinata) rappresenta la metodica più indicata. Per un'adeguata sorveglianza della progressione della patologia scheletrica, la DEXA dovrebbe essere effettuata ogni 12 mesi fino al raggiungimento del goal terapeutico, e successivamente ogni 24 mesi (**TAB 9**) (Pastores GM et al 1996).

## **Accrescimento staturale – ponderale**

Ottimizzare la crescita e normalizzare l'esordio della pubertà rientrano tra i goals terapeutici della terapia enzimatica sostitutiva con Cerezyme. Infatti, come riportato da Kaplan et al., i bambini affetti dalla GD, che iniziano la terapia enzimatica sostitutiva nel corso della seconda decade di vita, generalmente presentano un ritardo dell'inizio della pubertà, mentre in quelli che iniziano durante la prima decade l'inizio della pubertà risulta essere normale.

## **Coinvolgimento polmonare**

Un altro organo bersaglio dei macrofagi patologici nella GD è il polmone.

Solo 1-2% dei pazienti con GD 1 presenta un interessamento polmonare sotto forma di malattia polmonare interstiziale o malattia vascolare polmonare (severa ipertensione polmonare e/o sindrome epato-polmonare). Dati disponibili in letteratura, hanno permesso di evidenziare che l'ipertensione polmonare è generalmente responsiva alla ERT mentre la malattia polmonare interstiziale risulta meno sensibile alla ERT.

L'obiettivo primario della ERT nei pazienti che presentano un interessamento polmonare è cercare di migliorare la capacità funzionale e la qualità di vita di questi pazienti, evitare un progressivo peggioramento delle condizioni cliniche e prevenire la morte improvvisa; inoltre nei pazienti in cui è presente uno stato di ipertensione polmonare, la ERT dovrebbe essere in grado di migliorare lo stato funzionale ed emodinamico del paziente.

## **Efficacia della ERT**

Dal momento in cui la ERT è stata approvata nel 1991 sono stati raccolti dati sull'efficacia del trattamento, prendendo in considerazione l'obiettivo di curare soprattutto le complicanze scheletriche, le forme neurologiche e le manifestazioni viscerali ed ematologiche. Molteplici fattori possono condizionare la risposta alla ERT, quali ad esempio l'età di esordio, il tipo e il grado di compromissione degli organi coinvolti e infine la presenza o meno di complicanze irreversibili. Dosi iniziali di 30 – 60 U/Kg ogni 2 settimane di Cerezyme si sono dimostrate essere sicure ed efficaci nel migliorare rapidamente l'epatosplenomegalia, l'anemia, la trombocitopenia e la qualità di vita dei pazienti affetti (Barton NW et al 1991; Fallet S et al 1992; Pastores GM et al 1993; Verderese CL et al 1993). In alcuni pazienti, tuttavia, il raggiungimento dei goals terapeutici è

possibile solo attraverso un aumento delle dosi dell'ERT (come nel caso della fibrosi epatica, splenica o polmonare etc). Dosi > 60U/Kg sono state utilizzate solo molto raramente. I dati riportati in letteratura dimostrano che mentre i parametri ematologici e viscerali migliorano entro alcuni mesi, l'apparato scheletrico e il polmone rispondono alla ERT più lentamente. Inoltre, i dati raccolti hanno dimostrato che, in alcuni pazienti, la ERT può determinare miglioramenti sorprendenti dei sintomi e dei relativi segni radiologici. Negli studi pubblicati le risposte terapeutiche più coerenti alla ERT per la patologia scheletrica sono state la riduzione del dolore osseo, del numero e della gravità delle crisi ossee, la rimineralizzazione ossea e l'accelerazione della crescita. Alcuni dati suggeriscono che la ERT possa svolgere un ruolo anche nella prevenzione delle fratture e dell'osteonecrosi. Inoltre, con l'impiego di tecniche di diagnostica per immagini più sensibili, è stato possibile rilevare una risposta scheletrica soddisfacente entro il primo anno di ERT. I dati accumulati indicano anche l'eventuale necessità di un trattamento precoce per ottenere una risposta ottimale e prevenire danni irreversibili. Per ottenere ulteriori benefici clinici nella malattia scheletrica, una volta avviata la terapia enzimatica sostitutiva, è necessario continuare il trattamento per tutta la vita. Qualsiasi tipo di cambiamento della dose o dello schema terapeutico della ERT in un paziente stabile deve essere attentamente valutato ed effettuato con estrema cautela per evitare la comparsa di complicanze irreversibili e/o la perdita dei goals terapeutici.

Per le forme neurologiche la terapia mostra un eccellente profilo di sicurezza, migliora le implicazioni sistemiche associate alle forme neurologiche e, soprattutto, riscontri preliminari depongono per una stabilizzazione o un rallentamento delle implicazioni neurologiche in alcuni pazienti. La maggior parte dei pazienti con GD tipo 3, quindi, dal punto di vista neurologico resta stabile o migliora lievemente, per cui è probabile che un inizio del trattamento sin dalle prime settimane di vita possa ritardare o addirittura prevenire le complicanze neurologiche della malattia, migliorando la qualità della loro vita e forse prolungandola.

## **Reazioni avverse alla ERT**

Le reazioni avverse non sono comuni nei pazienti trattati con ERT. Si stima che circa il 15% dei pazienti trattati con Imiglucerasi hanno manifestato reazioni avverse sia IgE mediate e sia non-IgE mediate (Pastores GM et al 1993; Grabowski GA et al 1995). Le reazioni di ipersensibilità acuta (IgE mediate) sono estremamente rare. Circa il 5% presenta sintomi mediati dall'istamina, quali prurito, rash e occasionalmente laringospasmo.

## **Costi della ERT**

Il costo della ERT rappresenta un vero problema per molte nazioni. Il trattamento è molto costoso e per tale motivo è opportuno gestire al meglio l'utilizzo del farmaco, per cui numerosi studi sono stati condotti per stabilire le dosi ottimali e la frequenza delle somministrazioni.

## **Inibitori enzimatici o “Deprivazione di substrato”**

La ERT, come descritto in precedenza risulta sicuramente una strategia terapeutica sicura ed efficace, tuttavia presenta delle limitazioni, in primis l'impossibilità da parte dell'imiglucerasi (glicoproteina di  $\approx 60$ -kDa) di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE); la ERT inoltre non è in grado di risolvere tutti i problemi che comporta la GD; per tale motivo la ricerca si è orientata verso nuove alternative terapeutiche. Tra i nuovi approcci terapeutici introdotti per il trattamento della GD vi è la “riduzione di substrato (SRT)”. Questa nuova modalità di trattamento, sperimentata per la prima volta da Radin nel 1987 (InoKuchi and Radin 1987), sta suscitando molto entusiasmo, in quanto oltre che per la GD potrebbe essere utile per altri disordini di accumulo lisosomiale. L'obiettivo di questa strategia terapeutica è quello di ridurre la sintesi di glicosfingolipidi ad una velocità tale da consentire all'attività enzimatica residua di catabolizzare il substrato lisosomiale. A tale scopo, recentemente per il trattamento della GD è stato testato un iminozucchero, la N-butildeossinojirimycin (NB-DNJ o miglustat o OGT 918; **Zavesca®**, **Actelion Pharmaceuticals US, San Francisco, CA**), somministrabile per via orale, che inibisce in maniera reversibile, la

sintesi di glucosil-ceramide, attraverso l'inibizione della glucosiltransferasi, enzima responsabile della prima tappa della sintesi dei glicosfingolipidi (Cox et al. 2000, 2003). La glucosiltransferasi, infatti, catalizza il legame del glucosio al lipide. Tale approccio è stato studiato in diversi trial clinici che hanno permesso di evidenziare un miglioramento delle dimensioni del fegato e della milza e dei parametri ematologici, sebbene siano stati descritti diversi effetti collaterali, quali perdita di peso, sintomi gastrointestinali, diarrea, tremori, disturbi della funzione cognitiva e neuropatia periferica (Cox et al. 2000, 2003). Inoltre un elemento di particolare rilevanza da sottolineare è la capacità del miglustat, in virtù delle sue peculiari caratteristiche chimico-fisiche, di diffondere a livello tissutale; ciò rende questa nuova molecola un'arma molto interessante per il trattamento dei distretti poco raggiungibili da macromolecole, come l'apparato scheletrico e il cervello. Correntemente la terapia di riduzione del substrato è indicata nei pazienti adulti con GD di grado lieve o moderato che non possono o che rifiutano di continuare la ERT (Platt et al. 2001). Sulla base delle raccomandazioni della EWGGD (Expert members of the European Working Group on Gaucher disease), la N-butildeossinojirimycin è controindicata nei bambini, negli adolescenti, in gravidanza e durante l'allattamento.

L'uso combinato della ERT con la terapia di riduzione del substrato potrebbe rappresentare un valido approccio terapeutico, tuttavia tale opzione necessita di ulteriori studi (Cox et al. 2000, 2003; **Fig. 2 - Algoritmo diagnostico**).

Protocolli validi e standardizzati per la ERT e la deprivazione di substrato sono stati pubblicati (**TAB 7**)

## Chaperons

La terapia enzimatica sostitutiva (ERT) e la terapia di riduzione di substrato (STR) rappresentano le principali opzioni terapeutiche attualmente disponibili per il management della GD. Entrambi gli approcci terapeutici si sono rivelati efficaci nel migliorare i sintomi ematologici e viscerali nei pazienti con forme moderate e non neuronopatiche della GD; tuttavia la loro efficacia presenta alcune limitazioni: nel caso della ERT, l'enzima somministrato non è in grado di attraversare la BEE, mentre per quanto riguarda la STR, molte volte la terapia non può essere continuata per la comparsa di gravi effetti collaterali. Da qui, l'esigenza di cercare altre strategie terapeutiche.

Un altro approccio molto promettente per il trattamento delle manifestazioni cliniche associate alla GD è l'uso di piccoli composti, note con il nome di chaperons. Gli chaperons, sono piccole molecole che si legano al sito attivo dell'enzima glucocerebrosidasi, determinandone una stabilizzazione della struttura tridimensionale nel reticolo endoplasmatico, prevenendone in tal modo la degradazione da parte del proteasoma e favorendone il giusto trafficking all'interno dei lisosomi, dove può svolgere la sua attività. Diversi composti a basso peso molecolare (quali il glicerolo, il galattosio, il dimetilulfossido, etc.) sono attualmente in fase di sperimentazione come potenziali chaperons per il trattamento di diverse patologie d'accumulo. Per la GD diversi iminozuccheri (per es. isofagomine) sono attualmente in fase di studio come nuovi potenziali approcci terapeutici (Steet R et al. 2007).

## Terapia genica

Le prospettive per il futuro considerano la possibilità della terapia genica, oltre l'infusione enzimatica. Le moderne tecniche di biologia molecolare hanno permesso, negli ultimi anni, di conoscere i difetti genetici alla base di molte patologie ereditarie e consentono oggi di prendere in considerazione anche la possibilità di curare le malattie genetiche direttamente mediante la correzione della sequenza alterata del DNA nel genoma del paziente. Le tecniche di terapia genica consistono, infatti, nell'introduzione di una copia normale del gene non funzionante all'interno delle cellule del paziente mediante l'utilizzo di particolari vettori che non sono in grado di riprodursi, ma veicolano con alta efficienza il DNA esogeno. Gli sforzi principali in questo senso sono stati indirizzati verso alcune malattie genetiche che si manifestano a carico del sistema ematopoietico



ma, il miglioramento delle tecniche di trasferimento e l'utilizzo di vettori virali specifici per diversi tessuti consentirà molto rapidamente di sviluppare tecniche di terapia genica per tutti gli organi, incluso il sistema nervoso centrale.

## **FOLLOW-UP E MONITORAGGIO**

Protocolli per il follow-up dei pazienti con GD sono disponibili in letteratura (Charrow et al. 2004; Vellodi et al. 2001; Baldellou et al. 2004; Grabowski et al. 2004; Pastores GM et al 2004) e riportati nella **TAB 9 e 10**. La valutazione basale e il follow-up dei pazienti affetti da GD dovrebbe essere basato su un approccio multidisciplinare dei differenti organi e apparati, e sulla attenta valutazione delle indagini di laboratorio (emoglobina, piastrine, conta completa dei globuli bianchi, fattori della coagulazione, D-dimero, complesso trombina-antitrombina, sideremia, ferritina, proteine della fase acuta, dosaggio della chitotriosidasi) (**TAB 5**). Inoltre, nel corso del follow-up è importante effettuare una valutazione attenta del sistema nervoso centrale (esame fisico, IQ, indagini elettrofisiologiche e neuroradiologiche), dell'occhio (esame del fondo oculare, esame con lampada a fessura), dell'apparato respiratorio (test della funzionalità polmonare, presenza di apnee durante il sonno, ossimetria, radiografia del torace), del cuore (valutazione clinica, ECG, Ecocardio), degli organi addominali (esame obiettivo, ecografia, CT, MRI), dell'osso (radiografia, densità minerale ossea, MRI del midollo osseo), della crescita e dello stato nutrizionale. È fondamentale inoltre per la valutazione basale e per il follow-up dei pazienti raccogliere un'anamnesi molto dettagliata che valuti la presenza o meno delle seguenti condizioni: aumento della stanchezza, dolore osseo, epistassi/ecchimosi, dolore o distensione addominale, depressione, perdita di peso nell'ultimo periodo, distress respiratorio, riduzione dei movimenti articolari.

Anche i bambini affetti da GD non-neuronopatica, ma che sono asintomatici (bambini nei quali la diagnosi è stata effettuata mediante screening o sulla base della positività dell'anamnesi familiare) e/o anche i pazienti che presentano minimi segni o sintomi della GD e che non hanno iniziato la terapia enzimatica sostitutiva, devono essere monitorati regolarmente. Idealmente questi bambini devono effettuare una valutazione clinica accurata, in particolare dei parametri auxologici, ogni 6 mesi, e annualmente controllare i parametri ematologici e biochimici. Inoltre ogni 24 mesi devono praticare la MRI dello scheletro e la DEXA. Tuttavia la comparsa di segni o sintomi clinici deve precocemente indirizzare questi pazienti alla terapia enzimatica sostitutiva al fine di limitare fortemente le complicanze connesse alla malattia.

Infine, come indicato da Hollak e collaboratori (2001), se, dopo 6 mesi di ERT, la riduzione dell'attività della chitotriosidasi risulta essere inferiore al 15%, in combinazione con una risposta insufficiente di almeno uno dei parametri clinici valutati, occorre valutare la necessità di aumentare il dosaggio della ERT. Infine, in tutti i pazienti che ricevono la ERT, un aumento improvviso dei livelli della chitotriosidasi deve sempre far sospettare un peggioramento clinico e in tal caso occorre sempre valutare l'opportunità di un incremento del dosaggio.

## **REGISTRO GAUCHER**

Uno strumento molto utile per conoscere la storia naturale, per ulteriori investigazioni sulla correlazione genotipo-fenotipo e per il follow-up dei pazienti affetti da GD è il registro ICGG (International Collaborative Gaucher Group), che è il registro di osservazione cooperativo più grande sulla GD. Nato nel 1991 come database longitudinale per la raccolta degli esiti clinici di routine dei pazienti affetti da GD, il registro ICGG fornisce una fonte preziosa di dati clinici, utilissimo al fine di estrarre linee guida per una terapia efficace basata sulle evidenze.

## **CONSIDERAZIONI FINALI**

- La GD spesso si manifesta in età pediatrica.
- Una diagnosi precoce è indispensabile per prevenire le complicanze irreversibili, debilitanti e potenzialmente fatali.
- Il sospetto diagnostico di GD può basarsi su una attenta e accurata anamnesi, una scrupolosa visita medica generale, risultati di analisi specifiche e procedure di diagnostica per immagini.
- Ogni paziente è un caso unico e a sé stante per quanto riguarda età di insorgenza, sintomatologia clinica e velocità di progressione della malattia.
- Tutti i bambini affetti da GD che sono sintomatici dovrebbero essere trattati con ERT al fine di prevenire lo sviluppo di complicanze e favorire in tal modo un adeguato sviluppo attraverso l'infanzia e l'adolescenza.
- È ora riconosciuto che le complicanze ossee e le relative conseguenze spesso irreversibili, sono di solito l'aspetto più debilitante in assoluto della GD.
- Ulteriori studi sono necessari per meglio definire la patogenesi della patologia ossea nella GD.
- L'attento monitoraggio della malattia ossea è di vitale importanza per i bambini affetti da GD, in quanto le sequele risultanti dal coinvolgimento osseo determinano un alto grado di morbidità.
- Il follow-up attento della GD deve necessariamente includere un approccio multidisciplinare, che valuti lo stato psicosociale, funzionale e la qualità di vita dei pazienti affetti. Infatti molti pazienti possono presentare considerevoli problemi psicosociali e disturbi del comportamento. Nei bambini più grandi, l'organomegalia, il ritardo di crescita e pubertà possono avere effetti determinanti sull'immagine corporea, e ciò potrebbe causare lo sviluppo di pensieri e sentimenti non adeguati (bassa stima di sé stessi, sentimenti di rabbia, paura, insicurezza e di isolamento) o di problematiche molto importanti (problemi psicosessuali). Inoltre il dolore cronico, la splenomegalia, il coinvolgimento osseo possono avere un impatto altamente negativo sulla qualità di vita dei pazienti condizionandone l'inserimento nella società.
- Sulla base dei dati raccolti in letteratura (Erikson A 1986; Kyllerman M et al 1990), attualmente è noto che nelle forme di Gaucher neuronopatiche, la splenectomia totale o parziale è una procedura da non effettuare, in quanto associata ad un peggioramento della malattia, ad una progressione del coinvolgimento neurologico e osseo, ad aumentato rischio di infezioni, e probabilmente a ridotta risposta alla ERT (Czartoryska et al 2000).
- La terapia enzimatica sostitutiva (ERT) e la terapia di riduzione di substrato (STR) rappresentano le principali opzioni terapeutiche attualmente disponibili per il management della GD. Entrambi gli approcci terapeutici si sono rivelati efficaci nel migliorare i sintomi ematologici e viscerali nei pazienti con forme moderate e non neuronopatiche della GD; tuttavia la loro efficacia presenta alcune limitazioni: nel caso della ERT, l'enzima somministrato non è in grado di attraversare la BEE, mentre per quanto riguarda la STR, molte volte la terapia non può essere continuata per la comparsa di gravi effetti collaterali. Da qui, l'esigenza di ricercare altre potenziali strategie terapeutiche per il trattamento di alcune forme della GD (vedi chaperons).

**Tabella 1. Organi e apparati coinvolti nella GD e spettro dei sintomi (PARTE I)**

SCHELETRICO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• infiltrazione del midollo osseo</li> <li>• osteopenia</li> <li>• difetti di rimodellamento osseo (<i>deformità a bottiglia di Erlenmeyer</i>)</li> <li>• osteonecrosi</li> <li>• osteolisi, osteosclerosi</li> <li>• dolore cronico alle ossa o crisi ossee acute (<i>con febbre alta, brividi, leucocitosi, aumento della velocità di sedimentazione eritrocitaria</i>)</li> <li>• frattura ossea (<i>spontanea</i>)</li> <li>• ritardo della crescita scheletrica</li> </ul>
VISCERALI ADDOMINALI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• splenomegalia</li> <li>• epatomegalia (<i>può progredire in cirrosi, ipertensione portale, ascite, varici esofagee</i>)</li> <li>• colelitiasi</li> <li>• dolore addominale, sazietà precoce, sensazione di pienezza, diarrea</li> </ul>
SISTEMA EMATOLOGICO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anemia: <i>pallore, spossatezza, dispnea da sforzo, palpitazioni, necessità di regolari trasfusioni</i></li> <li>• trombocitopenia, anomalie della funzione piastrinica: <i>emorragia spontanea o problemi emostatici a seguito di trauma o intervento chirurgico, emorragia post-partum, massiva perdita di sangue con le mestruazioni</i></li> <li>• leucopenia: <i>maggior rischio di infezioni</i></li> </ul>

**Tabella 1. Organi e apparati coinvolti nella GD e spettro dei sintomi (PARTE II)**

<b>POLMONI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• malattia interstiziale / restrittiva dei polmoni con anomalie dei test di funzionalità polmonare</li> <li>• dispnea da sforzo, tachipnea, tosse, infezioni respiratorie ricorrenti</li> <li>• ipertensione polmonare con dispnea da sforzo o a riposo, sincope, cianosi, ippocratismo digitale</li> <li>• sindrome epatopolmonare</li> </ul>
<b>SNC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• per definizione, nessun sintomo a carico del SNC nella GD 1</li> <li>• spsticità, persistente retroflessione del capo, strabismo, aprassia oculomotoria, trisma, disfagia, stridore laringeo e riflessi tendinei profondi iperelicitabili nella GD 2</li> <li>• isolata paralisi orizzontale sopranucleare dello sguardo, attacchi tonico-clonici e mioclonici generalizzati resistenti al trattamento, demenza, spasticità progressiva e atassia, con progressiva degenerazione neurologica che porta al decesso il paziente tra i 20 e i 30 anni nella GD 3a</li> <li>• paralisi orizzontale sopranucleare dello sguardo e raramente crisi convulsive nella GD 3b</li> </ul>
<b>PELLE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• alterazione del colorito giallo/brunastra</li> <li>• ecchimosi, petecchie</li> </ul>
<b>CUORE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sintomi derivanti da cardiomiopatia restrittiva e difetti valvolari</li> </ul>
<b>OCCHI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• opacità, pinguecole</li> <li>• errore di inizio dei movimenti saccadici (aprassia oculomotoria) nel tipo 3</li> </ul>
<b>SISTEMA LINFATICO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• linfonodi ingrossati</li> <li>• interessamento del timo, placche di Peyer, adenoidi, tonsille</li> </ul>
<b>SISTEMA ENDOCRINO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• difficoltà a prendere peso</li> <li>• ritardo della pubertà</li> </ul>
<b>NEOPLASIE MALIGNI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• aumento del rischio di malattia neoplastica</li> </ul>

## TABELLA 2 – Malattia di Gaucher - tipi clinici

Da Beutler E, Grabowski GA (2001). Gaucher disease. In: Scriver CR; Beaudet AL; Sly WS; Valle D: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* - 8<sup>th</sup> edition, vol III. McGraw Hill, New York - 3635- 3668, modificata.

Caratteristiche Cliniche	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3a	Tipo 3b	Tipo 3c
<b>Insorgenza</b>	Adolescente / Adulto	Infanzia	Adolescente	Adolescente	Adolescente
<b>Epato-splenomegalia</b>	+ / +++	+	+++	+++	+
<b>Ipersplenismo</b>	+ / +++	+	+++	+++	+
<b>Crisi osse /fratture</b>	+ / +++	-	++	+++	+
<b>Compromissione neurologica</b>	-	+++	++	+	
<b>Sopravvivenza</b>	6 – 80 + (anni)	< 2 anni	Seconda a quarta decade	Seconda a quarta decade	Seconda a quarta decade
<b>Predilezione etnica</b>	Ebrei Ashkenazi	Panetnica	Nord della Svezia	Panetnica	Panetnica
<b>Frequenza</b>	1 : 60.000	1 : 100.000	1 : 50.000 – 100.000		

### **TABELLA 3 – Stadi radiologici delle lesioni scheletriche nella Malattia di Gaucher tipo 1**

*Da Beutler E, Grabowski GA (2001). Gaucher disease. In: Scriver CR; Beaudet AL; Sly WS; Valle D: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease - 8<sup>th</sup> edition, vol III. McGraw Hill, New York - 3635- 3668, modificata.*

<b>STADI</b>	<b>TIPO DI LESIONI / SITO COINVOLTO</b>	<b>MANIFESTAZIONI RADIOLOGICHE</b>
<b>1</b>	Osteoporosi diffusa / ossa tubulari e vertebre	Pattern grossolano trabecolare di osteoporosi
<b>2</b>	Dilatazione midollare / femore, ossa lunghe, costole	Perdita della normale concavità al di sopra dei condili femorali; deformità a bottiglia di Erlenmeyer
<b>3</b>	Distruzione localizzata (osteolisi) / ossa lunghe	Piccole erosioni (ben definite o tarlate); corticale rarefatta ed endo-ostio dentellato; aspetto a vetro-smerigliato
<b>4</b>	Necrosi ischemica, sclerosi, osteite / ossa lunghe	Aree di densità ed erosioni; linee sclerotiche serpiginose; segni di periostite
<b>5</b>	Distruzione diffusa; collasso vertebrale; osteoartrosi / anche, spalle, vertebre, articolazione sacro-iliaca	Distruzione irregolare o appiattimento della testa femorale o dell'omero; aree miste di lesioni litiche e sclerotiche; pattern di grandi “bolle di sapone”

**Tabella 4 - Età della popolazione dell'Europa occidentale al momento della diagnosi di Malattia di Gaucher**  
 (fonte: Registro di Malattia di Gaucher: Charrow J et al, The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease, 2000)

<i>Età al momento della diagnosi</i>	<i>Percentuale (%)</i>
<b>0 - &lt; 10 anni</b>	<b>42</b>
<b>10 - &lt; 16 anni</b>	<b>11</b>
<b>16 - &lt; 35 anni</b>	<b>30</b>
<b>35 - &lt; 65 anni</b>	<b>17</b>
<b>&gt; 65 anni</b>	<b>1</b>

**TABELLA 5** - Raccomandazioni per l'analisi delle manifestazioni sistemiche della Malattia di Gaucher non-neuronopatica (GD)

PRIMA VALUTAZIONE		
Radiografia: proiezione AP dei femori interi e proiezione laterale della colonna		
Indagini ematologiche		
RMN (primaria, pesata in T <sub>1</sub> e T <sub>2</sub> ) dei femori interi, e se possibile dell'anca e delle vertebre lombari	Analisi supplementari in base alle indicazioni	
DEXA: colonna lombare e collo femorale	Conta leucocitaria	Calcio
Valutazione polmonare		
Emoglobina		
Conta piastrinica	Fosfatasi alcalina	
ECG, radiografia toracica, ecocardiografia Doppler		Ferro
Marker biochimici	Bilirubina totale e diretta	Capacità di legame del ferro
- chitotriosidasi, ACE, TRAP		Ferritina
Attività della glucocerebrosidasi	Profilo dell'epatite	Vitamina B12
Analisi di mutazione	Albumina	
Dosaggio anticorpale	Proteine totali	PT
	Immunoelettroforesi sierica	PTT
Valutazione organomegalia		
Volume della milza e del fegato (RMN o TC volumetriche)		
Valutazione dello scheletro		



**Abbreviazioni riportate nella Tabella 5:**

ACE: enzima di conversione dell'angiotensina (angiotensin-converting enzyme);

ALT: alanina transaminasi (alanine transaminase)

AP: antero-posteriore

AST: aspartato transaminasi (aspartate transaminase)

CT: tomografia computerizzata (computer tomography)

DEXA: assorbiometria doppia a raggi X (dual-energy x-ray absorptiometry)

ECG = elettrocardiografia (electrocardiogram)

MRI: immagine di risonanza magnetica (magnetic resonance imaging)

PT: tempo di protrombina (prothrombin time)

PTT: tempo di tromboplastina parziale (partial thromboplastin time)

TRAP: fosfatasi acida tartrato-resistente (tartrate-resistant acid phosphatase)

**TABELLA 6 – Genotipo dei pazienti con malattia di Gaucher tipo 1** (*da Charrow J et al 2004*)

<b>GENOTIPO</b>	<b>Pazienti diagnosticati <i>prima dei 10 di anni</i> (n = 538)</b>	<b>Pazienti diagnosticati <i>Dopo i 10 di anni</i> (n = 836)</b>
<b>N370S / N370S</b>	<b>80 (15%)</b>	<b>412 (49%)</b>
<b>N370S / 84GG</b>	103 (19%)	50 (6%)
<b>L444P / L444P</b>	27 (5%)	3 (< 1%)
<b>L444P / altro allele*</b>	16 (3%)	8 (1%)
<b>N370S / IVS2+1</b>	20 (4%)	11 (1%)
<b>L444P / non noto</b>	21 (4%)	16 (2%)
<b>non noto / non noto</b>	15 (3%)	4 (< 1%)
<b>altro allele / altro allele</b>	28 (5%)	19 (2%)
<b>N370S / altro allele</b>	49 (9%)	60 (7%)
<b>N370S / L444P</b>	88 (16%)	118 (14%)
<b>N370S / non noto</b>	91 (17%)	135 (16%)

\* si riferisce ad ogni allele che è stato ben caratterizzato, ma non è stato incluso specificamente in questa tabella

**TABELLA 7 – Trattamento della Malattia di Gaucher**

Tipi	Pazienti	Miglustat (mg/die/div in 3)	Imiglucerasi (U/Kg/mese)	CONSIDERAZIONI
Non-neuronopatica (Tipo 1)	Tutti		30 – 120	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ridurre la dose quando si verificano miglioramenti dei sintomi</li> <li>➤ Aumentare la dose, se dopo 6 mesi di trattamento, nessun miglioramento si è osservato</li> <li>➤ Individualizzare il dosaggio</li> </ul>
	Pazienti “non eleggibili” per il trattamento con Imiglucerasi	300		Se compare diarrea ridurre la dose a 100 -200 mg/die
Cronica neuronopatica (Tipo 2)	Pazienti a rischio per “coinvolgimento neurologico”		120	Attento monitoraggio dei segni neurologici
	Pazienti con “coinvolgimento neurologico”		240 – 480	Iniziare con 240 U; <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Se il coinvolgimento neurologico progredisce, aumentare la dose a 480 U/Kg/mese per un breve periodo (<i>non più di 6 mesi</i>); Se dopo 6 mesi di trattamento, il coinvolgimento neurologico progredisce, la dose dovrebbe essere ridotta ad un dosaggio tale da controllare la malattia sistemica;</li> <li>➤ Se il paziente raggiunge l'età adulta e il coinvolgimento neurologico è stabile “è possibile” considerare una riduzione del dosaggio</li> </ul>
Acuta neuronopatica (Tipo 3)	Tipo A		240	Trial di 6 mesi con follow-up ogni mese
	Tipo B		Non raccomandato	

**TABELLA 8 - OBIETTIVI TERAPEUTICI** (*Weinreb NJ et al 2002, 2004; Pastores GM et al 2004*)

	TEMPI
<b>Ematologici</b>	
<p><b>ANEMIA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- aumento dell'emoglobina &gt; 12.0 g/dl (7,4 mmol/l) per gli uomini e &gt; 11,0 g/dl (6,8 mmol/l) per le donne e i bambini</li> </ul>	<b>1 – 2 anni</b>
<p><b>PIATRINOPENIA</b></p> <p><b>Milza intatta:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- nella trombocitopenia grave (&lt; 60.000/<math>\mu</math>L) → aumento della conta piastrinica di 1,5 volte, al fine di raggiungere un livello sufficiente a prevenire l'emorragia</li> <li>- in caso di trombocitopenia basale moderata (&gt; 60.000/<math>\mu</math>L ma &lt; 120.000/<math>\mu</math>L) → aumento della conta piastrinica di 1,5 – 2 volte</li> </ul> <p><b>Pazienti con pregressa splenectomia:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- normalizzazione della conta piastrinica</li> </ul>	<p><b>1 anno</b></p> <p><b>1 anno</b></p> <p><b>1 anno</b></p>

**TABELLA 8 - OBIETTIVI TERAPEUTICI** (*Weinreb NJ et al 2002, 2004; Pastores GM et al 2004*)

	TEMPI
<b>Viscerali</b>	
<b>Ridurre il volume epatico</b>	
- del 20% - 30%	<b>1 – 2 anni</b>
- del 30 % - 40 %	<b>3 – 5 anni</b>
<b>Ridurre il volume splenico</b>	
- del 30% - 50%	<b>1 anno</b>
- del 50 % - 60 %	<b>2– 5 anni</b>

**TABELLA 8 - OBIETTIVI TERAPEUTICI** (*Weinreb NJ et al 2002, 2004; Pastores GM et al 2004*)

	TEMPI
<b>Scheletrici</b>	
- ridurre o eliminare il dolore osseo	1 – 2 anni
- prevenire crisi ossee	1 – 2 anni
- prevenire l'osteonecrosi e cedimento articolazione subcondrale	1 – 2 anni
- raggiungere il picco massimo (o ideale) di massa osseo ( <i>bambini</i> )	2 anni
- aumentare densità minerale ossea corticale e trabecolare ( <i>adulti</i> )	3 – 5 anni
	TEMPI
<b>Pediatrici</b>	
- normalizzare la crescita	3 anni
- raggiungere inizio normale della pubertà	

**TABELLA 8 - OBIETTIVI TERAPEUTICI** (*Weinreb NJ et al 2002, 2004; Pastores GM et al 2004*)

	TEMPI
<b>Coinvolgimento polmonare</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- prevenire malattia polmonare con avvio tempestivo di Cerezyme evitando la splenectomia</li> <li>- prevenire rapido peggioramento della malattia polmonare e morte improvvisa del paziente</li> <li>- far regredire la sindrome epato-polmonare e la dipendenza da ossigeno</li> <li>- migliorare l'ipertensione polmonare (ERT + terapia aggiuntiva)</li> <li>- migliorare lo stato funzionale e la qualità di vita del paziente</li> </ul>	<b>non definiti</b>
<b>Altri</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- ridurre l'attività della chitotriosidasi nel plasma</li> </ul>	<b>1 anno</b>

**TABELLA 9 – Follow-up e monitoraggio della Malattia di Gaucher non-neuronopatica (GD)**

Valutazione basale		Pazienti non riceventi terapia		Pazienti riceventi terapia			
		Ogni 12 mesi	Ogni 12 – 24 mesi	Non raggiunto il “goal terapeutico”		Raggiunto il “goal terapeutico”	Al tempo del cambiamento del dosaggio o della comparsa di complicanze significative
				Ogni 3 mesi	Ogni 12 mesi	Ogni 12 - 24 mesi	
Esame fisico <sup>(1)</sup>		Ogni 6 mesi			Ogni 6 - 12 mesi		X
Ematologia	Emoglobina	X		X		X	X
	Piastrine	X		X		X	X
Biochimica	Chitotriosidasi e/o TRAP e/o ACE	X		X		X	X
Visceri	Milza volume (MRI / Ecografia)		X		X	X	X
	Fegato volume (MRI / Ecografia)		X		X	X	X
	Test di funzionalità polmonare	X			X	X	
	Funzione cardiovascolare (ECG, Ecocardiografia)	X			X	X	
Scheletro	MRI <sup>(2)</sup>		Ogni 24 mesi		X	X	X
	RX del torace, colonna vertebrale <sup>(3)</sup> , pelvi, ossa lunghe		X		X	X	X
	DEXA della colonna vertebrale e dell'anca		X		X	Ogni 24 mesi	X
Altro	Dolore	X			Ogni 6 - 12 mesi	X	X
	Qualità di vita <sup>(4)</sup>	X			X		X



Il “goal terapeutico” dovrebbe essere individualizzato, sulla base dei risultati di una valutazione complessiva del paziente che prende in esame segni associati con i visceri, parametri ematologici e scheletrici e una valutazione della qualità di vita. Nei pazienti pediatrici inoltre è importante raggiungere una buona crescita e un adeguato sviluppo.

**(1) l'esame fisico dovrebbe includere la valutazione di:**

**CUTE (lividi, petecchie, pallore)**

**ADDOME (valutazione epatosplenomegalia)**

**CRESCITA (peso, altezza, circonferenza cranica) utilizzando curve di crescita standardizzate, stato puberale utilizzando la classificazione in stadi di Tanner**

**FUNZIONALITÀ POLMONARE**

**RANGE DEL MOVIMENTO E ANDATURA**

**(2) scansione sagittale T1-pesata della colonna vertebrale, scansione coronale T1-pesata dei femori**

**(3) solo quando il paziente è sintomatico (es. dolore in sede dorsale), nel caso la malattia è severa e la crescita non brillante o sia presente cifosi**

**(4) sistema di score della qualità di vita**

**TRAP = fosfatasi acida tartrato resistente**

**ACE = enzima di conversione dell'angiotensina**

**MRI = immagine di risonanza magnetica**

**ECG = elettrocardiografia**

**RX = radiografia**

**TABELLA 10 – Follow-up neurologico e monitoraggio della Malattia di Gaucher neuronopatica cronica**

		Valutazione iniziale	Follow-up		
			Ogni 3 mesi	Ogni 6 mesi	Ogni 12 mesi
<b>Esame Clinico</b>	Esame neurologico	<b>X</b>	Nel corso del primo anno	<b>X</b>	
	Esame dei movimenti oculari	<b>X</b>		<b>X</b>	
	Esame neuro-oftalmologico con oftalmoscopia diretta	<b>X</b>			<b>X</b>
	Audiometria	<b>X</b>			<b>X</b>
<b>Neurofisiologia</b>	EEG	<b>X</b>	Sulla base della clinica (es. presenza di crisi comiziali)		
	BSER	<b>X</b>			<b>X</b>
<b>Neuroradiologia</b>	MRI e/o TC – cerebrale	<b>X</b>	Sulla base della valutazione della clinica		
<b>Neuropsicometria</b>	IQ	<b>X</b>			<b>X</b>

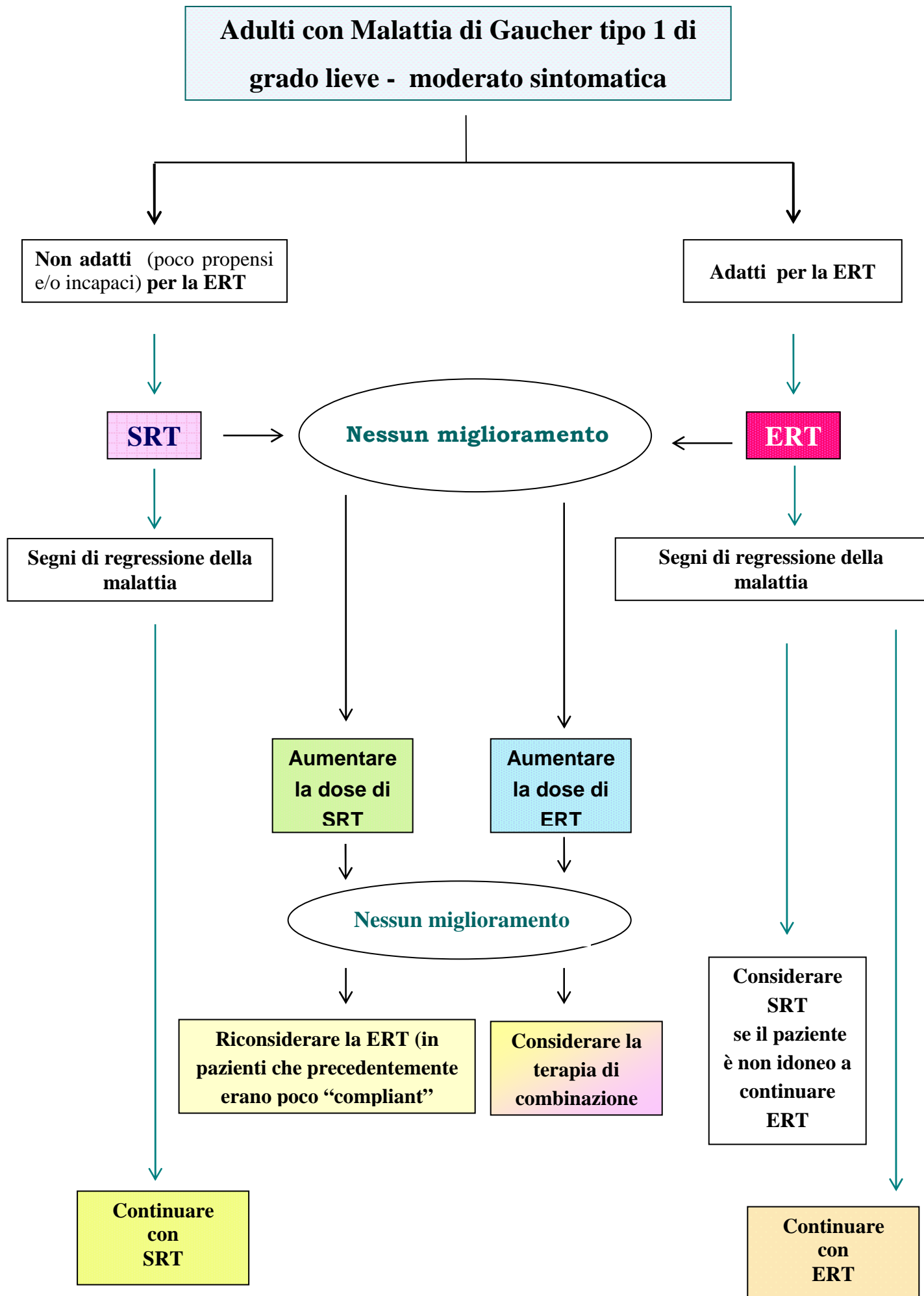
**MRI = immagine di risonanza magnetica**

**TC = tomografia computerizzata**

**EEG = elettroencefalogramma**

**BSER = potenziali evocati del tronco cerebrale**

**Fig. 2 - Algoritmo per il trattamento della Malattia di Gaucher tipo 1**



## BIBLIOGRAFIA

- Abrahamov A, Elstein D, Gross-Tsur V et al (1995). Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *Lancet* 346 (8981): 1000 -1003
- Alterini R, Rigacci L, Stefanacci S (1996). Pseudo-Gaucher cells in the bone marrow of a patient with centrocytic nodular non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 81: 282 -283
- Andria G, Parenti G (2003). Oligosaccharidoses and Related Disorders. In: Blau N; Duran M; Blaskovics ME; Gibson MK: *Physician's Guide to the Treatment and Follow-Up of Metabolic Diseases* - 2<sup>th</sup> edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; Chap. 19; 399-410
- Andria G, Parenti G (2006). Oligosaccharidoses and Related Disorders. In: Blau N; Hoffmann FG; Leonard J; Clarke TRJ: *Physician's Guide to the Treatment and Follow-Up of Metabolic Diseases*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; Chap. 19; 205-215
- Baldellou A, Andria G, Campbell PE, Charrow J, Cohen I, Grabowski GA, Harris CH, Kaplan P, McHugh K, Mengel E, Vellodi A (2004). Paediatric non – neuronopathic Gaucher disease: recommendation for treatment and monitoring. *Eur J Pediatr* 16:67 – 75
- Barone R, Pavone P, Grosso M, Marzullo E, Romeo G, Fiumara A (2000). Chitotriosidasi: a marker for the diagnosis and follow-up of Gaucher disease. *Riv Ital Pediatr (IJP)* 26: 328 – 332
- Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, et al. (1991). Replacement therapy for inherited enzyme deficiency – macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher disease. *N Engl J Med* 324: 1464 – 1470
- Barranger JA, Rice E, Sakallah SA, Sansieri C, Mifflin TE, Cooper DL (1995). Enzymatic and molecular diagnosis of Gaucher disease. *Clin Lab Med* 15: 899 - 913
- Bembi B, Ciana G, Mengel E, Terk MR, Martini C, Wenstrup RI (2002). Bone complications in children with Gaucher disease. *Br J Radiol* 75 [Suppl 1]: A37 – A44
- Beutler E, Kuhl W, Trinidad F, Teplitz RL, Nadler HL (1971). Beta-glucosidase activity in fibroblasts from homozygotes and heterozygotes for Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 23: 62- 68
- Beutler E, Saven A (1990). Misuse of marrow examination in the diagnosis of Gaucher disease. *Blood* 76: 646- 648
- Beutler E, Grabowski GA (2001). Gaucher disease. In: Scriver CR; Beaudet AL; Sly WS; Valle D: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* - 8<sup>th</sup> edition, vol III. McGraw Hill, New York ; 3635-3668
- Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Blik J, de Meulemeester TM, Mannens MM, Aerts JM (1998). The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 273: 25680 – 25685
- Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D (1965). Metabolism of glucocerebrosides II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 18 (2) : 221 – 225

Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, Rosenbloom BE, Scott CR, Wappner RS, Weinreb NJ, Zimran A (2000). The Gaucher Registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med* 160: 2835 – 2843

Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, Prakash – Cheng A, Rosenbloom BE, Scott CR, Wappner RS, Weinreb NJ (2004). Enzyme replacement therapy and monitoring for children with type 1 Gaucher disease: consensus recommendation. *J Pediatr* 144: 112 – 120

Charrow J, Dulisse B, Grabowski GA, Weinreb NJ (2007). The effect of enzyme replacement therapy on bone crisis and bone pain in patients with type 1 Gaucher disease. *Clin Genet*. Mar; 71(3):205-211

Cox TM, Aerts JMFG, Andria G, Beck M, Bembi B, Chertkoff R, Elstein D, Erikson A, Giralto M, Heitner R, Hollak C, Hrebicek M, Lewis S, Pastores G, Rolfs A, Sa Miranda MC, Zimran A (2003). The role of iminosugar N-butyldeoxynojirimycin (miglustat) in the management of type 1 (non-neuronopathic) Gaucher's disease: a position statement. *J Inherit Metab Dis* 26: 513 – 526

Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, Van Weely S, Hrebicek M, Platt F, Butters T, Dwek R, Moyses C, Gow I, Elstein D, Zimran A (2000). Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* 355: 1481 – 1485

Czartoryska B, Tylki-Szymanska A, Lugowska A (2000). Changes in serum chitotriosidase activity with cessation of replacement therapy (cerebrosidase) administration in Gaucher disease. *Clin Biochem* 33: 147 – 149

de Fost M, Vom Dahl S, Weverling GJ, Brill N, Brett S, Haussinger D, Hollak CE (2006). Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe. *Blood Cells Mol Dis* 36 (1): 53-58

Desnick RJ (1982). Gaucher disease: a century of delineation and understanding. *Prog Clin Biol Res* 95: 1 – 30

Erikson A (1986). Gaucher disease – Norrbottnian type (III). Neuropaediatric and neurobiological aspects of clinical patterns and treatment. *Acta Paediatr Scand Suppl* 326: 1 – 42

Fallet S, Grace ME, Sibille A, Mendelson DS, Shapiro RS, Hermann G, et al (1992). Enzyme augmentation in moderate to life-threatening Gaucher disease. *Pediatr Res* 31:496-502.

Fujimoto A, Tayebi N, Sidransky E (1995). Congenital ichthyosis precede neurologic symptoms in two sibs with type 2 Gaucher disease. *Am J Med Genet* 59:356

Garfinkel D, Sidi Y, Ben-Bassat M, Salomon F, Hazaz B, Pinkhas J (1982). Coexistence of Gaucher's disease and multiple myeloma. *Arch Intern Med* 142: 2229

Ginns EI, Choudary PV, Tsuji S, Martin B, Stubblefield , Sawyer J, Hozier J, Barranger JA: Gene mapping and leader polypeptide sequence of human glucocerebrosidase: Implications for Gaucher disease. (1985). *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7101

Giraldo P, Cenarro A, Alfonso P, Perez-Calvo JI, Rubio-Felix D, Giralto M, et al. (2001). Chitotriosidase genotype and plasma activity in patients with type I Gaucher disease and their relatives (carriers and non carriers). *Haematologica* 86:977-984

Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, et al. (1995). Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann Intern Med* 122: 33 – 39

Grabowski GA, Saal HM, Wenstrup RJ, Barton NW (1996). Gaucher disease: a prototype for molecular medicine. *Crit Rev Oncol Hematol* 23: 25 – 55

Grabowski GA, Andria G, Baldellou A, Campbell PE, Charrow J, Cohen I, Grabowski GA, Harris CH, Kaplan P, Mengel E, Pocovi M, Vellodi A (2004). Paediatric non – neuronopathic Gaucher disease: presentation, diagnosis and assessment. *Eur J Pediatr* 163: 58 – 66

Hill SC, Damaska BM, Ling A, Patterson K, Di Bisceglie AM, Brady RO et al. (1992). Gaucher disease: abdominal MR imaging findings in 46 patients. *Radiology* 184: 561 – 566

Hollak CE, Maas M, Aerts JM (2001). Clinically relevant therapeutic endpoints in type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 24 [Suppl 2]: 97 – 105

Ho MW, O' Brien JS (1971). Gaucher's disease: Deficiency of "acid" betaglucosidase and reconstitution of enzyme activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 2810

Ida H, Rennert OM, Kato S, Ueda T, Oishi K, Maekawa K, Eto Y(1999). Severe skeletal complications in Japanese patients with type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 22 : 63 – 73

Inokuchi J, Radin NS (1987). Preparation of the active isomer of 1-phenyl-2-decanoyl-amino-3-morpholino-1-propanol inhibitor of murine glucocerebrosidase synthetase. *J Lipid Chem* 28 : 565 – 571

Kaplan P, Mazur A, Manor O, Charrow J, Esplin J, Gribble TJ, Wappner RS, Wisch JS, Weinreb NJ (1996). Acceleration of retarded growth in children with Gaucher disease after treatment with alglucerase. *J Pediatr* 129: 149 – 153

Katz K, Horev G, Grunebaum M, Yosipovitch Z (1996). The natural history of osteonecrosis of the femoral head in children and adolescents who have Gaucher disease. *J Bone Joint Surg Am* 78: 14 – 19

Kauli R, Zaisov R, Lasar L, Pertzalan A, Laron Z, Galatzer A, Philip M, Yaniv Y, Cohen U (2000). Delayed growth and puberty in patients with Gaucher disease type 1: natural history and effect of splenectomy and/or enzyme replacement therapy. *Isr Med Assoc* 12: 158 – 163

Kerem E, Elstein D, Abrahamov A, Bar Ziv Y, Hadas-Halpern I, Melzer E, Cahan C, Branski D, Zimran A (1996). Pulmonary function abnormalities in type I Gaucher disease. *Eur Respir J* 9 : 340

Kyllerman M, Conradi N, Mansson JE, Percy AK, Svennerholm L (1990). Rapidly progressive type III Gaucher disease: deterioration following partial splenectomy. *Acta Paediatr Scand* 79: 448 – 453

Knox-Macaulay H, Bhusnurmath S, Alwaily A (1997). Pseudo-Gaucher's cells in association with common acute lymphoblastic leukemia. *South Med J* 90 (1): 69 -71

Koprivica V, Stone DL, Park JK, Callahan M, Frisch A, Cohen IJ, et al. (2000). Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 66: 1777 – 1786

- Lacerda L, Amaral O, Pinto R, Aerts J, Sa Miranda MC (1994). The N370S mutation in the glucocerebrosidase gene of Portuguese type 1 Gaucher patients: Linkage to the PvuII polymorphism. *J Inherit Metab Dis* 17: 85
- Maas M, Poll LW, Terk MR (2002). Imaging and quantifying skeletal involvement in Gaucher Disease. *Br J Radiol* 75 (Suppl 1): A13 – A24
- Malatack JJ, Consolini DM, Bayever E (2003). The status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease. *Pediatr Neurol* 29: 391 – 403
- Mankin HJ, Doppelt SH, Rosenberg AE, Barranger JA (1990). Metabolic bone disease in patients with Gaucher's disease. In Avioli LV, Krane SM, eds. *Metabolic bone disease*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia (PA): WB Sanders; p. 730 – 752
- Moran MT, Schofield JP, Hayman AR, et al (2000). Pathologic gene expression in Gaucher disease: up-regulation of cysteine proteinases including osteoclastic cathepsin K. *Blood* 96: 1969-78
- Parkin JL, Brunning RD. Pathology of the Gaucher cell (1982). *Prog Clin Biol Res* 95: 150 – 75
- Pastores GM, Grabowski GA (1993). Enzyme therapy in Gaucher disease type 1: dosage, efficacy and adverse effects in 33 patients treated for 6 to 24 months. *Blood* 82: 408 – 416
- Pastores GM, Einhorn TA (1995). Skeletal complications of Gaucher disease: pathophysiology, evaluation, and treatment. *Semin Hematol* 32 (3, Suppl 1): 20 – 27
- Pastores GM, Weinreb NJ, Aerts H, Andria G, Cox TM, Giralto M, Grabowski GA, Mistry PK and Tytki-Szymańska A (2004). Therapeutic Goals in the Treatment of Gaucher Disease. *Semin Hematol* 41 (Suppl 5): 4 – 14
- Pastores GM, Wallenstein S, Desnick RJ, Luckey MM (1996). Bone density in type I Gaucher disease. *J Bone Miner Res* 11: 1801 - 1807
- Patrick AD: Short communications (1965). A deficiency of glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *Biochem J* 97: 17C
- Patterson MC, Horowitz M, Abel RB, Currie JN, Yu K-T, Kaneski C, Higgins JJ, O'Neill RR, Fedio P, Pikus A, Brady RO, Barton NW (1993). Isolated horizontal supranuclear gaze palsy as a marker of severe systemic involvement in Gaucher's disease. *Neurology* 43
- Platt FM, Jeyakumar M, Andersson U, Priestman DA, Dwek RA, Butters TD, Cox TM, Lachmann RH, Hollak C, Aerts JM, Van Weely S, Hrebicek M, Moyses C, Gow I, Elstein D, Zimran A (2001). Inhibition of substrate synthesis as a strategy for glycolipid lysosomal storage disease therapy. *J Inherit Metab Dis* 24: 275 – 290
- Sawkar AR, D'Haese W and Kelly JW (2006). Therapeutic strategies to ameliorate lysosomal storage disorders – a focus on Gaucher disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1179 - 1192
- Shiran A, Brenner B, Laor A, Tatarsky I (1993). Increased risk of cancer in patients with Gaucher disease. *Cancer* 72: 219
- Sibille A, Eng CM, Kim SJ, Pastores G, Grabowski GA (1993). Phenotype/genotype correlations in Gaucher disease type 1: clinical and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 52: 1094 – 1101

Sidransky E, Ginns EI (1993). Clinical heterogeneity among patients with Gaucher's disease. *JAMA* 269 : 1154 – 1157

Solis OG, Belmonte AH, Ramaswamy G, Tchertkoff V (1986). Pseudogaucher cells in *Mycobacterium avium* intracellular infections in acquired immune deficiency syndrome (AIDS) Feb 85 (2): 233 – 235

Steet R, Chung Stephen, Lee WS, Pine CW, Do H, Kornfeld S (2007). Selective action of the iminosugar isofagomine, a pharmacological chaperone for mutant forms of acid- $\beta$ -glucosidase. *Biochemical Pharmacology*, May 1;73(9): 1376-1383

Stowens DW, Teitelbaum SL, Kahn AJ, Barranger JA (1985). Skeletal complications of Gaucher disease. *Medicine* 64: 310 – 322

Theophilus B, Latham T, Grabowski GA, Smith FI (1989). Gaucher disease: molecular heterogeneity and phenotype-genotype correlations. *Am J Hum Genet* 45: 212 – 225

Vellodi A, Bembi B, Villemeur TB de, Collin – Histed T, Erikson A, Mengel E, Rolfs A, Tylki – Szimanska A (2001). Management of neuronopathic Gaucher disease: a European consensus. *J Inherit Metab Dis* 24: 319 – 327

Vellodi A, Foo Y and Cole TJ (2005). Evaluation of three biochemical markers in the monitoring of Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 28: 585 – 592

Verderese CL, Graham OC, Holder-McShane CA, Harnett NE, Barton NW (1993). Gaucher's disease: a pilot study of the symptomatic responses to enzyme replacement therapy. *J Neurosci Nurs* 25: 296 - 301.

Vom Dahl S, Poll Ludger, Di Rocco M, Ciana G, Denes C, Mariani G and Maas M (2006). Evidence-based recommendations for monitoring bone disease and the response to enzyme replacement therapy in Gaucher patients. *Current Medical Research and Opinion* 22 (6): 1045 - 1064.

Weinreb NJ, Charrow J, Andersson HC, et al. (2002). Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment; a report from the Gaucher Registry. *Am J Med* 113: 112 – 119

Weinreb NJ, Aggio MC, Andersson HC, et al. (2004); International Collaborative Gaucher Group (ICGG). Gaucher disease type 1: revised recommendations on evaluations and monitoring for adult patients. *Semin Hematol* 2004; 41(4 Suppl 5): 15 – 22

Wenstrup RJ, Roca-Espiau M, Weinreb NJ, Bembi B (2002). Skeletal aspects of Gaucher disease: a review. *Br J Radiol* 75 [Suppl 1]: A2 – A12

Zimran A, Sorge J, Gross E, Kubitz M, West C, Beutler E (1989). Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level. *Lancet II* 349 – 352

Zimran A, Elstein D, Kannai R, et al. (1994). Low dose enzyme replacement therapy for Gaucher's disease: effects of age, sex, genotype, and clinical features on response to treatment. *Am J Med* 97: 3 – 13



# QUANDO SOSPETTARE UNA MALATTIA METABOLICA

---

Michelina Sibilio, Iris Scala, Generoso Andria

***Dipartimento di Pediatria dell'Università di Napoli "Federico II"***

## **Definizione**

Le malattie metaboliche ereditarie o **errori congeniti del metabolismo (ECM)** sono malattie genetiche in cui sono alterate le normali funzioni metaboliche. Generalmente le malattie metaboliche sono considerate malattie molto rare. Tuttavia questo è vero se le consideriamo singolarmente, ma non è vero se vengono considerate come gruppo.

La grande maggioranza delle malattie metaboliche congenite è ereditata in maniera autosomica recessiva. Meno frequentemente, gli ECM sono ereditati con modalità legata all'X (*per esempio, il Deficit di Ornitina Transcarbamilasi, malattia X-linked, quasi sempre letale per i maschi*) o autosomica dominante. Inoltre, alcuni ECM, anche se molto rari, hanno una ereditarietà matrilineare. Questi tipi di disordini sono dovuti a mutazioni del genoma mitocondriale. È noto che solo i mitocondri dell'ovocita, e non degli spermatozoi, contribuiscono al DNA mitocondriale dello zigote; pertanto mutazioni del DNA mitocondriale sono trasmesse da una generazione alla successiva solo attraverso la linea materna.

Sono stati identificati più di 450 ECM differenti sul piano biochimico, ma, nonostante la loro diversità, essi hanno in comune un certo numero di caratteristiche. Infatti, la maggior parte dei pazienti con ECM si presenta sul piano clinico con uno dei cinque fenotipi generali (*Danno neurologico acuto, Danno neurologico cronico, Danno epatocellulare diffuso, Miopatia, Danno tubulare renale*), come riportato nella **Tabella 1**.

Per la correttezza della diagnosi degli ECM è sempre molto importante raccogliere in modo accurato l'**anamnesi familiare** (infatti, genitori consanguinei o provenienti dallo stesso piccolo centro o con lo stesso cognome e/o una storia di morte nel periodo neonatale suggeriscono fortemente una malattia genetica). Considerando la rarità degli ECM, è molto importante per il medico sospettare la malattia e considerarla nella diagnostica differenziale. Il sospetto diagnostico può salvare la vita dei pazienti (molte malattie metaboliche sono attualmente curabili) e anche nei casi più gravi è necessaria una diagnosi corretta che consenta di fornire un consiglio genetico alle famiglie.

**Tabella 1** Presentazioni cliniche **più comuni** degli errori congeniti del metabolismo<sup>1</sup>

---

## **DANNO NEUROLOGICO**

### **A. Danno neurologico acuto**

#### **Malattie di piccole molecole diffusibili**

Disordini degli aminoacidi (malattia delle urine a sciroppo d'acero)  
Disordini degli acidi organici (aciduria metilmalonica)  
Difetti dell'ossidazione degli acidi grassi (deficit di acil-CoA deidrogenasi a media catena)  
Iperammoniemie (deficit di ornitina transcarbamilasi)  
Disordini del lattato e disordini mitocondriali (deficit di citocromo c ossidasi)  
Danno neurologico con convulsioni (iperglicinemia non chetotica)

### **B. Danno neurologico cronico**

#### **Malattie di piccole molecole diffusibili**

#### **Malattie di organelli**

*Malattie mitocondriali*  
Difetti della catena di trasporto degli elettroni (deficit di citocromo c ossidasi)  
Difetti del metabolismo del piruvato (deficit di piruvato deidrogenasi)

#### **Malattie da accumulo lisosomiale**

Mucopolisaccaridosi (malattia di Hurler), Glicoproteinosi ( $\alpha$ -mannosidosi), Gangliosidosi (gangliosidosi  $G_{M2}$ )  
Altre sfingolipidosi (malattia di Gaucher), Leucodistrofie (leucodistrofia metacromatica)  
*Disordini perossisomiali*  
Difetti della biogenesi e della  $\beta$ -ossidazione perossisomiale (sindrome di Zellweger)  
Condrodisplasia punctata rizomelica, Adrenoleucodistrofia legata all'X, Altri difetti di singoli enzimi perossisomiali (ossalosi)

#### **Disordini della glicosilazione proteica – Comprende i difetti enzimatici localizzati in:**

*Citosol:* sindrome da difetto di glicosilazione tipo Ia e Ib  
*Disordini dell'apparato di Golgi:* sindrome da difetto di glicosilazione tipo II  
*Reticolo endoplasmatico:* sindrome da difetto di glicosilazione tipo Ic e V

### **C. Danno epatocellulare diffuso**

#### **Epatopatia acuta o cronica**

Difetti del metabolismo dei carboidrati (galattosemia), Difetti del metabolismo degli aminoacidi (tirosinemia)  
Difetti del trasporto dei metalli (malattia di Wilson), Difetti degli inibitori delle proteasi (deficit di  $\alpha_1$ -antitripsina)

### **D. Miopatia**

#### **Miopatia scheletrica**

Rabdomiolisi acuta (deficit di fosforilasi muscolare)  
Miopatia cronica (difetti della catena di trasporto mitocondriale degli elettroni; difetti del metabolismo degli acidi grassi)

#### **Miocardiopatia**

Malattie da accumulo lisosomiali (malattia di Pompe: deficit di  $\alpha$ -glucosidasi)  
Disordini del metabolismo degli acidi grassi (deficit di 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi)

### **E. Danno tubulare renale**

#### **Danno glomerulare tubulare**

Malattie da accumulo lisosomiale (cistinosi)  
Difetti enzimatici (ossalosi)

Miopatia cronica (difetti della catena di trasporto mitocondriale degli elettroni; difetti del metabolismo degli acidi grassi)

#### **Difetti del trasporto**

Difetti di trasporto di singole molecole o di gruppi di molecole simili (cistinuria)

<sup>1</sup> Tra parentesi sono riportati degli esempi.

(CoA = coenzima A; HRPT = ipoxantina fosforibosiltransferasi; MELAS = miopatia mitocondriale, danno neurologico, acidosi lattica ed episodi simili a ictus)

---

Modificata da John Christodoulou: Approccio clinico agli errori congeniti del metabolismo. Manuale di Pediatria (Rudolph), 1<sup>a</sup> Ed. italiana, McGraw-Hill, 2003

## A. Approccio al paziente con danno neurologico acuto

Una compromissione neurologica è certamente la manifestazione clinica più comune tra gli ECM. Le manifestazioni neurologiche possono essere acute, intermittenti, croniche o anche progressive. Per la maggior parte degli ECM che causano danno neurologico acuto **l'esordio** si verifica nel periodo neonatale (essendo il periodo neonatale un periodo in cui è molto intenso lo stress catabolico); tuttavia gli ECM possono manifestarsi a qualsiasi età. Gli ECM che causano manifestazioni cliniche durante il periodo neonatale sono solitamente gravi e spesso possono condurre a morte il bambino se non viene iniziata prontamente una terapia adeguata. I neonati e/o i bambini affetti da ECM possono presentare uno o più tra molteplici segni e sintomi (**Fig. 1, Tab. 2**). In linea generale, un quadro di compromissione neurologica acuta, secondario ad un ECM, è generalmente causato dall'**accumulo nel cervello** di "**piccole molecole diffusibili**" (aminoacidi, acidi organici, acidi grassi, ammonio), oppure dal **deficit di un prodotto essenziale** (per esempio, il deficit del metabolismo del piruvato o della funzione mitocondriale della catena di trasporto degli elettroni) o infine dal **deficit di un processo di trasporto delle piccole molecole attraverso le membrane cellulari**.

Nel caso di **esordio neonatale**, tipicamente il neonato affetto appare alla nascita in buone condizioni cliniche, ma dopo un periodo di latenza (alcuni ore, giorni o una settimana), si ha la comparsa di sintomatologia d'allarme, quale rifiuto dell'alimentazione, vomito persistente (occasionalmente molto grave tanto da suggerire una stenosi ipertrofica del piloro), letargia, irritabilità, scarso accrescimento, disidratazione, diarrea, ipotonia, acidosi metabolica, ittero, convulsioni etc. In alcune malattie del metabolismo è possibile anche il riscontro di un odore caratteristico (per esempio, *odore di piedi sudati* nella isovalericacidemia). È da ricordare che gli odori insoliti vanno ricercati sulle urine, nell'alito e sulla pelle.

Nel caso di **esordio tardivo**, (bambino o un adulto) il paziente può godere di buona salute per anni o decenni, ma improvvisamente, generalmente in occasione di periodo di intenso stress catabolico quale infezioni intercorrenti o la gravidanza, può manifestare segni neurologici (atassia, riduzione della coscienza, disorientamento, etc.), espressione di un quadro di compromissione neurologica acuta.

Le principali malattie metaboliche che si possono presentare con un quadro di danno neurologico acuto sono:

- *Aminoacidopatie (per esempio, la Malattia delle urine a sciroppo d'acero)*
- *Acidosi organiche (per esempio, la Propionicoacidemia)*
- *Difetti dell'ossidazione degli acidi grassi;*
- *Iperammoniemie (per esempio, il Deficit di ornitina transcarbamilasi)*
- *Acidosi lattiche*

Le manifestazioni cliniche, le indagini di approfondimento diagnostico e le eventuali terapie di questo gruppo di patologie sono riportate in **tabella 4**.

## Diagnosi

Come riportato sopra, nel caso di esordio neonatale, per molti ECM i segni clinici sono solitamente aspecifici (difficoltà nell'alimentazione, vomito, ittero, sintomatologia acuta neurologica etc.) e simili a quelli che si osservano nei lattanti con infezione generalizzata (sepsi). Pertanto in un neonato gravemente malato, nella diagnosi differenziale bisogna sempre considerare la possibilità di un ECM e, se l'indice di sospetto è alto, effettuare indagini specifiche per una conferma diagnostica (**Fig. 1**). Un'*anamnesi di progressivo deterioramento clinico in un neonato* precedente normale deve sempre suggerire un errore congenito del metabolismo. Ai fini diagnostici è utile ricordare che molte malattie genetiche o lesioni perinatali causano alterazioni dal momento stesso della nascita. *All'esame obiettivo* è possibile riscontrare segni clinici aspecifici (epatomegalia, coinvolgimento del sistema nervoso centrale). Occasionalmente, il riscontro di un odore insolito può rivelarsi fondamentale per la diagnosi. **In molti casi bastano poche indagini di laboratorio di primo livello per identificare il gruppo di malattie** (per esempio, la glicemia, l'equilibrio acido-base, l'ammoniemia, l'acido lattico etc.), come illustrato nella **tabella 3**.

La determinazione delle concentrazioni sieriche dell'ammonio e dell'equilibrio acido-base (pH e Bicarbonati) risulta spesso molto utile nel differenziare le principali cause di disordini metabolici (**Fig. 1**). Il riscontro di valori elevati di ammoniemia, in assenza di acidosi metabolica, è solitamente determinato da difetti enzimatici del ciclo dell'urea (*forma primitiva di iperammoniemia*), come è possibile notare nella **figura 1**.

Tuttavia è bene ricordare che l'iperammoniemia nel neonato può essere secondaria a cause non di natura genetica, quali: asfissia neonatale, distress respiratorio del prematuro, basso peso alla nascita, iperammoniemia transitoria del prematuro, infezioni urinarie da *Proteus*, shunt portosistemici, insufficienza epatica acuta.

**La diagnosi di certezza** solitamente richiede una varietà di indagini di laboratorio specifiche (per esempio, l'aminoacidemia, gli acidi organici urinari, l'acido orotico urinario, il profilo delle acilcarnitine plasmatiche etc.).

Purtroppo per alcune malattie metaboliche non sempre è possibile identificare il difetto enzimatico; tuttavia definire la diagnosi specifica è fondamentale per fornire la consulenza genetica alla famiglia. A tal fine, si dovrebbe cercare di fare ogni tentativo per determinare la diagnosi mentre il bambino è ancora vivo, dato che l'esame autoptico non sempre è utile.

Per quanto riguarda gli **ECM responsabili di una compromissione neurologica acuta con insorgenza tardiva**, la diagnosi risulta molte volte più difficile, in quanto in questo gruppo di malattie l'esordio è più insidioso. I pazienti affetti da queste forme di ECM possono godere di buona salute per anni o decenni e manifestare poi all'improvviso il difetto metabolico con un quadro neurologico acuto (generalmente scatenati da uno stress o da un episodio aspecifico come un'infezione anche banale). Molto probabilmente, questi pazienti possiedono un'attività enzimatica residua sufficiente per poter catabolizzare il substrato in condizioni di benessere clinico; tuttavia, in condizioni di stress catabolico (quali gravidanza, infezioni intercorrenti, etc.) l'attività enzimatica residua non è in grado di prevenire l'accumulo delle sostanze tossiche. Inoltre, in alcuni pazienti, le prime manifestazioni cliniche possono essere aspecifiche (ritardo mentale, deficit motori, convulsioni, epatopatia) ed essere erroneamente attribuite a cause perinatali o erroneamente diagnosticati come *Sindrome di Reye*. In linea generale gli ECM con esordio tardivo dovrebbero essere presi in considerazione ogni qual volta un bambino presenta una o più delle seguenti manifestazioni: ritardo mentale sine causa, ritardo dello sviluppo, deficit motori o convulsioni, odore insolito (particolarmente in occasione di un episodio acuto), episodi, intermittenti di vomito inspiegabile, acidosi, deterioramento mentale, coma, epatomegalia, calcolosi renale e infertilità.

**Figura 1**

**Neonato con uno dei seguenti sintomi o segni clinici:**

- Difficoltà ad alimentarsi
- Vomito
- Letargia
- Convulsioni
- Coma

{ Senza risposta all'infusione di glucosio o calcio endovena

**Sospetta alterazione metabolica**

**Infezione**

*richiedere*  
**ammoniemia plasmatica**

**Elevata**

**Normale**

*richiedere*  
**pH e CO<sub>2</sub> ematici (EAB)**

*richiedere*  
**pH e CO<sub>2</sub> ematici (EAB)**

**Normale**

**Acidosi**

**Normale**

**Difetto del  
ciclo  
dell'urea**

**Acidemia organica**

**Aminoacidopatie o  
Galattosemia**

**Aminoacidemia**

**Pattern  
specifico**

**Pattern  
aspecifico**

**Citrullinemia  
Argininosuccinico aciduria  
Argininemia  
Intolleranza alle proteine con lisinuria**

**oroticoaciduria**

**Normale**

**Aumentata**

**Deficit di CP sintetasi  
Deficit di N-acetil-glutamato sintetasi**

**Deficit di OCT**

## Tabella 2

Segni clinici **aspecifici** in pazienti con ECM

### **Sintomo generali**

Stentato accrescimento

### **Sintomo gastrointestinali**

Vomito

Rifiuto dell'alimentazione

Distensione addominale

Epatomegalia

Diarrea

### **Sintomo respiratori**

Polipnea

Crisi di apnea

### **Sintomo neurologici**

Sonnolenza, torpore profondo, coma

Tremori, convulsioni, turbe del tono muscolare

Disturbi della suzione o della deglutizione

Alterazione dei riflessi arcaici

**Tabella 3**

Anormalità biochimiche ed ematologiche associate a malattie metaboliche responsabili di  
sintomatologia acuta nel neonato o piccolo lattante

<b>IPOGLICEMIA</b>	{		Malattia delle urine a sciroppo d'acero, Glicogenosi
			Organicoacidurie, Tirosinemia tipo I acuta
			Galattosemia, Intolleranza ereditaria al fruttosio
			Deficit di fruttosio-1,6-difosfatasi, Deficit di piruvato carbossilasi
			Deficit di carnitina
<b>ACIDOSI METABOLICA</b>	{		Organicoacidurie, Malattia delle urine a sciroppo d'acero
			Glicogenosi tipo I, Galattosemia, Intolleranza ereditaria al fruttosio
			Latticoacidosi congenite
<b>CHETOSI</b>	{		Malattia delle urine a sciroppo d'acero, Organicoacidurie
			Glicogenosi tipo I, Deficit di Fruttosio-1,6-difosfatasi
			Deficit di Piruvato Carbossilasi
<b>IPERAMMONIEMIA</b>	{		Sindromi iperammoniemiche da deficit degli enzimi del ciclo dell'urea,
			Organicoacidurie, Deficit di Piruvato Carbossilasi, Deficit di carnitina
<b>SEGNI EMATOLOGICI</b>	{		
	<b>NEUTROPENIA</b>	→	Glicogenosi tipo Ib, Organicoacidurie Tirosinemia tipo I acuta Deficit di Carbamilfosfato Sintetasi
	<b>PIASTRINOPENIA</b>	→	Organicoacidurie, Galattosemia Intolleranza ereditaria al fruttosio
	<b>ANEMIA</b>	→	Organicoacidurie, Galattosemia Intolleranza ereditaria al fruttosio

## Prognosi

I fattori che sono determinanti per la prognosi delle malattie metaboliche che causano un quadro di compromissione neurologica acuta sono diversi, ma certamente tra i più importanti abbiamo: età alla diagnosi, gravità del quadro clinico neonatale (*per le forme con esordio neonatale*), genotipo, controllo metabolico a lungo termine.

## Trattamento

Una volta posta la diagnosi è fondamentale, soprattutto per gli errori congeniti del metabolismo che si presentano nel periodo neonatale, iniziare immediatamente una **terapia specifica** (se disponibile), per ridurre al minimo il rischio di danno neurologico permanente.

Durante la fase acuta, è fondamentale per questi pazienti ridurre l'accumulo di metaboliti dannosi presenti in circolo, in particolare a livello cerebrale. Ciò in alcune patologie è realizzabile attraverso l'uso di **diete speciali** (per esempio, la dieta ipoproteica per le organicoacidurie e per i difetti del ciclo dell'urea), **di integratori** (es. miscele di aminoacidi prive dell'aminoacido precursore dannoso, come nel caso della Malattia delle urine a sciroppo d'acero), attraverso la **stimolazione di vie metaboliche alternative** per consentire la eliminazione del composto tossico sotto forma di un substrato non dannoso e facilmente eliminabile dall'organismo [es. sodiofenilbutirrato (Ammonaps) o sodio benzoato per le iperammoniemie] o attraverso la **somministrazione di cofattori** (per esempio, la Biotina per la Propionicoacidemia o la vitamina B<sub>12</sub> in alcuni casi di Acidemia metilamalonica) e infine attraverso l'uso di metaboliti carenti (per esempio, l'arginina nei Difetti del Ciclo dell'urea).

È fondamentale inoltre valutare sempre attentamente lo stato di idratazione, fornire un'adeguata alimentazione (normo-ipercalorica), correggere eventuali squilibri metabolici secondari associati (quali l'acidosi e/o l'iperammoniemie per le organicoacidurie, l'ipoglicemia per i difetti dell'ossidazione degli acidi grassi). Molte volte, questi pazienti sono costretti a seguire diete molto ristrette, pertanto per favorire un adeguato sviluppo è fondamentale supplementare la dieta con integratori o vitamine.

**Gli obiettivi della terapia a lungo termine** delle malattie metaboliche che causano un quadro di compromissione neurologica acuta sono: mantenere nella norma le concentrazioni plasmatiche e urinarie di metaboliti tossici, favorire una crescita normale e un adeguato stato nutrizionale, consentire un normale sviluppo psicomotorio e infine cercare di evitare episodi di scompenso metabolico (es. acidosi per le organicoacidurie).

Tra i **nuovi approcci terapeutici** applicati ad alcune malattie metaboliche, abbiamo i trapianti (per esempio, per le Organicoacidurie) e la terapia genica; tuttavia i dati disponibili in letteratura non sono ancora molto incoraggianti.

Nel corso del **follow-up**, è di grande importanza nel bambino con malattie metaboliche, valutare periodicamente l'equilibrio metabolico, la crescita, l'adeguatezza dell'apporto nutrizionale, lo sviluppo psicomotorio e la presenza di eventuali problemi psicologici. Infine, è molto importante monitorare attentamente la comparsa di eventuali complicanze sistemiche (per esempio, l'insufficienza renale cronica nei pazienti con Metilmalonicoacidemia e la cardiomiopatia nei pazienti con Propionicoacidemia) per poter cercare di mettere in atto (se esistono) adeguate strategie preventive per migliorare la qualità di vita di questi pazienti.



**Tabella 4 (I parte)** Principali gruppi di malattie metaboliche associate a danno neurologico acuto

Malattia	Definizione	Manifestazioni cliniche	Prima batteria d'esami	Indagini di approfondimento diagnostico	Terapia
Aminoacidopatie	<p><b>Malattia delle urine a sciropo d'acero (MSUD)</b></p> <p><i>Frequenza:</i> 1 : 100.000 – 300.000 nati  <i>Ereditarietà:</i> autosomica recessiva  <i>Difetto di base:</i> alterazione del metabolismo degli aminoacidi a catena ramificata (Leucina, Isoleucina, Valina) causato dal deficit del complesso <math>\alpha</math>-chetodeidrogenasi degli aminoacidi ramificati, che utilizza la tiamina pirofosfato come coenzima.</p>	<p><b>Forma acuta:</b> dopo un intervallo libero (5-6 giorni) → difficoltà nell'alimentazione, apatia, letargia, vomito, ipoglicemia, alopecia, ulcerazione corneale, desquamazione, pancreatiti, convulsioni, ipotonia e/o ipertonìa, nistagmo, opistotono, difficoltà respiratoria con crisi di apnea, danno neurologico progressiva, edema cerebrale, coma; se non trattata → ritardo mentale grave, fino ad exitus.  Odore caratteristico delle urine, del sudore e del cerume a tipo «sciropo d'acero» o zucchero caramellato  <b>Forma intermittente</b> → bambini apparentemente normali in concomitanza di episodi stressanti (<i>infezioni, interventi chirurgici</i>) → vomito, odore di sciropo d'acero, letargia fino a coma  <b>Forma cronica:</b> ipotonia, stanchezza muscolare, ipotrofia muscolare, convulsioni, ritardo mentale progressivo, disturbi del comportamento</p>	<p>Esiste lo screening neonatale</p> <p>Test qualitativi urinari (DNPH)</p> <p>Urine → Chetonuria</p> <p>Glicemia → Ipoglicemia</p> <p>Equilibrio acido-base (EAB) → Acidosi metabolica</p>	<p><b>Aminoacidi</b> (plasma) con dosaggio di (<i>prelievo dopo 2–4 ore dal pasto</i>):  Leucina (LEU) (↑↑);  Isoleucina (ILE) (↑);  Valina (VAL) (↑);</p> <p><b>Acidi organici</b> (urine): ↑ cheto e idrossiacidi a catena ramificata (<i>per es.</i> 2 OH-acido isovalerico, 2-acido chetoisocaproico)</p> <p><b>Dosaggi enzimatici</b> (su leucociti e/o fibroblasti)</p> <p><b>Analisi molecolare</b></p> <p><b>Diagnosi prenatale:</b> è possibile</p>	<p><b>SCOMPENSO ACUTO</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Eliminare dalla dieta ILE, LEU, Val</li> <li>2. Fornire alimentazione normo-ipercalorica → 120–150 kcal/Kg/die per bambini, 80-100 per ragazzi, 40-5 per adulti con integratori calorici e formule prive di Ile, Leu, Val (<i>gavage, glucosata, lipidi e.v.</i>)</li> <li>3. Somministrare un adeguato apporto di liquidi (<i>gavage, e.v.</i>)</li> <li>4. Correggere squilibri associati (<i>disidratazione, acidosi, elettroliti</i>)</li> <li>5. <i>Eventualmente</i> → Dialisi peritoneale, emofiltrazione, emodiafiltrazione</li> </ol> <p><b>A LUNGO TERMINE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ <b>Dieta</b> a basso contenuto di aminoacidi a catena ramificata (<i>da continuare per tutta la vita</i>), con adeguato apporto calorico fornito da carboidrati, lipidi e miscele aminoacidiche prive di Leucina, Valina ed Isoleucina per favorire in tal modo una crescita normale e prevenire il ritardo mentale.</li> <li>■ Trapianto di fegato</li> </ul>
Acidosi organiche	<p><b>Propionicoacidemia (PPA):</b> alterazione del metabolismo dell'acido propionico. L'acido propionico è il prodotto del catabolismo degli aminoacidi isoleucina, valina, treonina e metionina, degli acidi grassi a catena dispari di atomi di carbonio e del colesterolo.</p> <p><i>Frequenza:</i> 1 : 100.000 nati  <i>Ereditarietà:</i> autosomica recessiva</p> <p><i>Difetto di base:</i> propionil-CoA-carbossilasi (PCCA, PCCB), enzima che richiede come cofattore la biotina. L'enzima è composto da due subunità non identiche, alfa (PCCA) e beta (PCCB). La biotina è legata alla subunità alfa. La propionil-CoA-carbossilasi catalizza la conversione del propionil-CoA a metilmalonil-CoA.</p>	<p><b>Forma acuta:</b> dopo un intervallo libero (48-72 ore) → rifiuto dell'alimentazione, vomito, crescita stentata, distensione addominale, disidratazione, ipotonia assiale, ipertonìa periferica, tachipnea (<i>risposta fisiologica compensatoria all'acidosi</i>), epatomegalia (moderata), alopecia, ulcerazione corneale, desquamazione, letargia, segni neurologici fino a coma → <b>exitus</b>  <b>Complicanze:</b> ritardo mentale, convulsioni, comparsa di movimenti extrapiramidali, osteoporosi, pancreatite, cardiomiopatia  <b>Forma intermittente</b> → Si manifesta generalmente nei primi mesi o anni di vita con problemi di alimentazione, crescita insufficiente, ipotonia, RSPM, vomito e/o letargia dopo l'assunzione di cibi proteici o in corso di infezioni intercorrenti  <b>Forma tardiva</b> → anoressia persistente, vomito cronico, crescita stentata, ipotonia, stanchezza muscolare, ipotrofia muscolare, convulsioni, ritardo mentale progressivo, disturbi del comportamento  <b>Diagnosi differenziale con:</b> malattia da reflusso gastro-esofageo  intolleranza alle proteine del latte vaccino  malattia celiaca</p>	<p>Equilibrio acido-base (EAB): grave acidosi (pH &lt; 7.30)</p> <p>GAP Anionico (↑↑; &gt; 20 mEq/l)</p> <p>Ammoniemia (↑ o ↑↑)</p> <p>Chetosi</p> <p>Glicemia (N o ↓ o ↑);</p> <p>Emocromo → anemia, neutropenia piastrinopenia, pancitopenia</p>	<p><b>Aminoacidemia quantitativa:</b>  Glicina (↑);  Alanina (↑);</p> <p><b>Profilo acilcarnitine plasmatiche (TMS):</b>  ↑↑ propionilcarnitina</p> <p><b>Carnitina</b> (↓)</p> <p><b>Acidi organici</b> (urine): ↑↑↑ metilcitrato, propionilglicina, acido tiglico, 3-OH-propionato, propionato</p> <p><b>Dosaggio enzimatico</b> (fibroblasti o leucociti)</p> <p><b>Analisi molecolare</b></p> <p><b>Diagnosi prenatale:</b> è possibile</p>	<p><b>SCOMPENSO ACUTO</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Eliminare parzialmente o totalmente le proteine dalla dieta</li> <li>2. Fornire alimentazione normo-ipercalorica → (vedi MSUD)</li> <li>3. Somministrare un adeguato apporto di liquidi (<i>gavage, e.v.</i>)</li> <li>4. Correggere squilibri associati (<i>disidratazione, acidosi, elettroliti, iperammoniemia</i>)</li> <li>5. Carnitina e.v. (250 – 500 mg/kg/die)</li> <li>6. Metronidazolo: 10-20 mg/Kg/die</li> <li>7. <i>Eventualmente</i> → Dialisi peritoneale emodialisi, exanguinotrasfusione</li> </ol> <p><b>A LUNGO TERMINE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ <b>Dieta a ridotto contenuto di proteine</b> (<i>da continuare per tutta la vita</i>), con adeguato apporto calorico, integrata con miscele aminoacidiche prive di precursori dell'acido propionico (<i>Isoleucina, Valina, Treonina e Metionina</i>) per favorire in tal modo una crescita normale e prevenire il ritardo mentale.</li> <li>■ <b>Carnitina:</b> 100 mg/kg/die <i>per os</i></li> <li>■ <b>Biotina:</b> 10 – 20 mg/die <i>per os</i></li> <li>■ <b>Metronidazolo:</b> 10-20 mg/Kg/die</li> <li>■ <b>Trapianto di fegato:</b> dati disponibili in letteratura non incoraggianti</li> </ul>

**Tabella 4 (II parte) Principali gruppi di malattie metaboliche associate a danno neurologico acuto**

Malattia	Definizione	Manifestazioni cliniche	Prima batteria d'esami	Indagini di approfondimento diagnostico	Terapia
Iperammoniemia	Alterazione del processo di detossificazione dell'ammonio (proveniente dalle proteine esogene e dal catabolismo endogeno) secondaria a difetti genetici degli enzimi coinvolti nel ciclo dell'urea: N-acetilglutammatosintetasi (NAGS) Carbamilfosfato sintetasi (CPS) Ornitina transcarbamilasi (OTC) Argininosuccinico sintetasi (ASS) Argininosuccinico liasi (ASL) Arginasi  <i>Frequenza:</i> <i>CPS</i> 1: 62.000 nati <i>OCT</i> 1: 14.000 " <i>ASS</i> 1: 57.000 " <i>ASL</i> 1: 70.000 " <i>Arginasi</i> 1: 363.000 "  <i>Ereditarietà:</i> autosomica recessiva (fatta eccezione per il deficit di ornitina transcarbamilasi, disordine legato all'X)	<b>Esordio neonatale</b> (entro le prime 24-48 ore di vita): torpore, difficoltà nell'alimentazione, tachipnea, emorragie intracraniche, convulsioni, danno neurologico progressivo fino a coma iperammoniemico, shock, insufficienza epatica con difetti della coagulazione, epatomegalia (in alcune forme, quale l'ASL) e se non trattata → ritardo mentale grave, fino ad exitus.  <b>Esordio tardivo:</b> scarsa crescita, difficoltà di alimentazione, vomito, disturbi del comportamento, ritardo dello sviluppo psicomotorio, anomalie dei capelli (ASL), episodi di disorientamento irritabilità, aggressività ed episodi ricorrenti di scompenso associati ad elevati apporti di proteine, a catabolismo o a stress; estrema variabilità per eterozigoti per OCT dipendente dall'inattivazione del cromosoma X	Ammoniemia (↑↑ o ↑↑↑)  Funzionalità epatica: alterata  Coagulazione : alterata	<b>Aminoacidemia quantitativa:</b> pattern specifico per ciascun difetto enzimatico es. in OTC → <b>Glutammina</b> (↑↑) <b>Alanina</b> (↑↑) <b>Citrullina</b> (↓) <b>Arginina</b> (↓)  <b>Acido orotico urinario:</b> (↑) nel deficit di OTC  <b>Studi enzimatici</b>  <b>Studi di genetica molecolare</b>	<b>SCOMPENSO ACUTO</b>  1. Eliminare totalmente le proteine dalla dieta 2. Fornire alimentazione normo-Ipercalorica 3. <i>Eventualmente</i> → Dialisi peritoneale o emodialisi  <b>Farmaci per iperammoniemia:</b> CPS – OCT <b>Sodio Benzoato:</b> 250 mg/Kg <b>Sodio Fenilbutirrato</b> (Ammonaps): 250 mg/Kg <b>L-Arginina:</b> 210 mg/Kg da diluire in 25-35 ml/Kg di glucosata al 10% da infondere in 90 minuti; poi stesso programma, infondere in 24 ore  <b>A LUNGO TERMINE</b>  ▪ <b>Dieta</b> a ridotto contenuto di proteine. ▪ <b>Metabolici intermedi del ciclo dell'urea</b> per rifornire il ciclo, specifici per ciascun difetto enzimatico (es. OTC → <b>Citrullina</b> : 170 mg/Kg/die) ▪ <b>Attivazione di vie metaboliche alternative</b> per favorire l'escrezione di ammonio (OTC → <b>Sodiofenilbutirrato:</b> 500 mg/Kg/die ▪ <b>Trapianto di fegato</b> (es. CPS)
Difetti dell'ossidazione degli acidi grassi	Difetti genetici di un gruppo di enzimi ( <b>deidrogenasi degli acidi grassi a catena molto lunga, lunga, media, corta; enzimi di trasporto della carnitina e degli acidi grassi a catena lunga</b> attraverso la membrana plasmatica o una delle membrane mitocondriali) coinvolti nel processo di ossidazione degli acidi grassi.  <i>Ereditarietà:</i> autosomica recessiva  <i>Fisiopatologia:</i> in corso di digiuno prolungato, le riserve epatiche di glicogeno vengono esaurite e si ha l'attivazione della lipolisi, che mette in circolo acidi grassi che vengono trasformati in corpi chetonici attraverso il processo di β-ossidazione. I corpi chetonici sono poi utilizzati direttamente dal cervello e dal muscolo come fonte energetica alternativa.	Vomito, letargia rapidamente progressiva fino a coma ipochetotico e ipoglicemico in corso di <b>digiuno</b> (> 12 ore) o in <b>corso di stati catabolici</b> (digiuno prolungato, interventi chirurgici, infezioni etc.)  <i>I seguenti sintomi possono comparire in associazione variabile, a seconda del difetto enzimatico:</i> <i>SNC:</i> Convulsioni <i>Cuore:</i> miocardiopatia, aritmie <i>Fegato:</i> epatomegalia, insufficienza epatica; <i>Muscolo:</i> miopatia (muscolo scheletrico e cardiaco) <i>Sindrome da morte improvvisa del lattante (SIDS)</i> <i>Rene:</i> Rene policistico ( <i>nel deficit multiplo delle acil-CoA deidrogenasi</i> ) <i>Dimorfismi facciali (nel deficit multiplo delle acil-CoA deidrogenasi)</i>  <i>Per deficit più lievi dell'ossidazione degli acidi grassi a catena lunga e del trasportatore di carnitina → interessamento del muscolo scheletrico</i> (debolezza muscolare cronica, dolori o, raddomolisi ricorrente) <i>oppure aritmie o cardiomiopatia</i>	Glicemia (↓↓)  Urine: stick per chetoni (↓↓)  <b>RACCOMANDAZIONI:</b>  1. In corso di ipoglicemia, conservare un campione di siero o plasma per aumentare al massimo la possibilità di fare la diagnosi.  2. Raccogliere e congelare un campione di urine	<b>Glicemia, cortisolo, insulina, ormone della crescita</b> <b>Enzimi epatici, CK, mioglobina, coagulazione</b> <b>Profilo acilcarnitine plasmatiche (TMS)</b> <b>Acidi grassi liberi su siero o plasma</b> (↑↑) <b>Chetoni</b> (3-idrossibutirrato) → (N o ↓) <b>Lattato</b> (↑↑) <b>Ammoniemia</b> (↑) <b>Carnitina</b> totale plasmatica (↓) <b>Acidi organici</b> (urine) in corso di digiuno o in fase acuta: (↓) corpi chetonici; (↑↑) acidi dicarbossilici a catena media <b>Studi enzimatici</b> <b>Studi di genetica molecolare</b>	▪ <b>Evitare digiuni prolungati</b>  ▪ <b>Dieta</b> ( <i>preferibilmente</i> ) a <b>ridotto contenuto di grassi e ricchi di carboidrati</b> (60-70% delle calorie totali)  ▪ <b>Carnitina</b> (nel deficit di carnitina): 100 mg/kg/die <i>per os</i>  ▪ <b>Riboflavina</b> (nel deficit multiplo delle acil-CoA deidrogenasi): 150 mg/die

## B. Approccio al paziente con danno neurologico cronico

A differenza del danno neurologico acuto, la cui drammaticità di presentazione clinica induce più facilmente a sospettare una malattia metabolica, la diagnosi di un bambino con un ritardo di sviluppo lentamente progressivo o non progressivo, isolato od associato ad altro disordine neurologico o ad altre manifestazioni sistemiche, è un problema più comune e di più difficile risoluzione. Nonostante questa difficoltà, le cause genetiche devono sempre essere considerate ed escluse per le implicazioni terapeutiche e di consiglio genetico alla famiglia.

Le principali malattie metaboliche che si possono presentare con un quadro di danno neurologico cronico sono:

- *la fenilchetonuria;*
- *l'omocistinuria;*
- *le malattie lisosomiali;*
- *le malattie mitocondriali;*
- *le malattie perossisomiali.*
- *le varianti meno gravi delle enzimopatie che, nella forma classica, sono associate ad danno neurologico acuto (discusse precedentemente);*

Le manifestazioni cliniche, le indagini di approfondimento diagnostico e le eventuali terapie di questo gruppo di patologie sono riportate in **tabella 5**.

**Tabella 5.** Principali gruppi di malattie metaboliche associate a danno neurologico cronico

Malattia	Definizione	Manifestazioni cliniche	Prima batteria d'esami	Indagini di approfondimento diagnostico	Terapia
Fenilchetonuria	Alterazione del metabolismo della fenilalanina causato da difetto dell'enzima Fenilalanina Idrossilasi	Ritardo mentale progressivo Convulsioni Disturbi del Comportamento	Esiste lo screening neonatale	Aminoacidemia con dosaggio di: Fenilalanina (↑); Tirosina (↓);  Analisi molecolare per mutazioni dell'enzima Fenilalanina Idrossilasi	La dieta a basso contenuto di fenilalanina, iniziata entro i primi giorni di vita, previene le manifestazioni neurologiche
Omocistinuria	Alterazione del metabolismo dell'omocisteina causata da difetti dell'enzima Cistationina β-sintasi	<i>SNC</i> : ritardo mentale <i>Occhi</i> : miopia elevata, lussazioni del cristallino <i>Ossa</i> : osteoporosi, habitus marfanoide <i>Altro</i> : aumentato rischio di trombosi venose o arteriose	Omocisteina plasmatica (↑↑; > 150 μmol/l)	Aminoacidemia: Metionina (↑); Cisteina (↓);	Piridossina (50-100 mg/die); Betaina (100 mg/kg/die); Acido folico (10 mg/die); Idrossicobalamina (1 mg/die); Vitamina C (100 mg/die)  Dieta a basso contenuto di metionina
M. Lisosomiali	Difetti genetici degli enzimi lisosomiali che provocano l'accumulo di substrati nell'organello e, di conseguenza, nelle cellule e negli organi coinvolti	Coinvolgimento multisistemico: <i>SNC</i> : ritardo mentale, macrocrania, convulsioni; <i>Facies</i> : grossolana; <i>Ossa</i> : disostosi multipla; <i>Occhi</i> : anomalie del fondo, retinopatia, cataratta <i>Altro</i> : epatosplenomegalia; linfociti vacuolati	RX cranio, mani, colonna, ossa lunghe; visita oculistica con lampada a fessura + fondo oculare	Striscio di sangue periferico; Glicosaminoglicani e oligosaccaridi urinari;  RMN encefalo; Potenziali evocati somatosensoriali  Dosaggi enzimatici	Per alcune di queste malattie da accumulo è attualmente in fase sperimentale la terapia enzimatica sostitutiva.
M. Mitochondriali	Difetti dei complessi enzimatici coinvolti nella produzione di energia tramite la fosforilazione ossidativa  Difetti del DNA mitocondriale.	Coinvolgimento multisistemico che interessa gli organi con forti fabbisogni energetici. I seguenti sintomi possono comparire in associazione variabile: <i>SNC</i> : danno neurologico acuto o subacuto, ritardo mentale, convulsioni, atassia, disfagia, oftalmoplegia, sordità, retinopatia. <i>Muscolo</i> : Ipotonia, rabdomiolisi; <i>Cuore</i> : Miocardiopatia, difetti di conduzione; <i>Rene</i> : s. Fanconi; <i>Fegato</i> : insufficienza epatica progressiva; <i>Altro</i> : malassorbimento, anemia, neutropenia, diabete.	Emocromo Funzionalità epatica e renale; CPK + isoenzimi (↑↑); Mioglobina urinaria (↑); Acido lattico plasmatico (↑);  Visita oculistica con fondo; EEG ECG	Acido lattico nel liquor; Aminoacidi su plasma e liquor; Acidi organici urinari;  RMN encefalo; Biopsia muscolare; Potenziali evocati somatosensoriali;  Studi enzimatici; Studi di genetica molecolare	Le opzioni terapeutiche sono scarse e di dubbia efficacia e consistono in: L-Carnitina (50-100 mg/kg/die); Trattamento acidosi; Adeguate apporto energetico di liquidi ed elettroliti; Altri trattamenti sintomatici.
M. Perossisomiali	Disordini della funzione perossisomiale che comprende β-ossidazione degli acidi grassi a lunga catena, l'ossidazione di acido fitanico e la biosintesi di colesterolo, acidi biliari e fosfolipidi nel SNC, nel muscolo e nel cuore.	<i>SNC</i> : danno neurologico grave fin dalla nascita, ipotonia, epilessia, sordità; <i>Ossa</i> : arti corti, calcificazioni a spruzzo; <i>Occhi</i> : retinopatia, cataratta, cecità; <i>Facies</i> : dimorfismi, anomalie cranio-facciali; <i>Fegato</i> : epatite neonatale, epatosplenomegalia, colestasi, cirrosi.	Colesterolo (N o ↓); Bilirubina (N o ↑); Altre indagini di funzionalità epatica; RX cranio, mani, colonna, ossa lunghe; visita oculistica con lampada a fessura + fondo oculare	Acidi grassi a catena molto lunga; Plasmalogeni eritrocitari; Acido fitanico; Acido pristanico; Intermedi acidi biliari; Test enzimatici.	Fondamentalmente sintomatica

### C. Malattie metaboliche con patologia epatica diffusa

Come riportato nella tabella 6, alcuni difetti della funzione mitocondriale, della beta-ossidazione ed alcune malattie d'accumulo (es. la malattia di Niemann-Pick) possono presentare un coinvolgimento epatico nell'ambito di un quadro clinico più complesso.

Tuttavia, un piccolo gruppo di errori congeniti del metabolismo si presenta principalmente con malattia epatocellulare diffusa ad esordio neonatale o nel corso della prima infanzia.

I segni generali di presentazione sono l'epatomegalia, l'ittero (iperbilirubinemia diretta ed indiretta), il danno della funzione protido-sintetica con riduzione primaria dei fattori della coagulazione, aumento degli enzimi epatici, ipoglicemia. Il sospetto diagnostico di questa classe di malattie metaboliche è molto importante in quanto il trattamento precoce è spesso in grado di ridurre il danno tissutale.

Tra queste malattie ricordiamo:

- *la galattosemia;*
- *l'intolleranza al fruttosio;*
- *la tirosinemia;*
- *il deficit di alfa-1-antitripsina;*
- *la malattia di Wilson;*
- *la glicogenosi tipo IV.*

**Tabella 6.** Principali malattie metaboliche associate a patologia epatica diffusa

Malattia	Definizione	Manifestazioni cliniche	Prima batteria d'esami	Indagini di approfondimento diagnostico	Terapia
Galattosemia	Alterazione del metabolismo del galattosio causata da difetto dell'enzima galattosio-1P-uridiltransferasi	Sintomi progressivi dal 3°-4° giorno di vita dopo l'inizio dell'assunzione di latte: vomito, diarrea, ittero, insufficienza epatica, sindrome di Fanconi renale. Progressiva cataratta bilaterale Possibile: sepsi, ipoglicemia	Esiste lo screening neonatale in alcune Regioni Sostanze riducenti nelle urine (spesso negative) Funzionalità epatica e renale  Visita oculistica (lampada a fessura)	Test enzimatici Analisi mutazionale	La dieta a basso contenuto di galattosio e lattosio
Intolleranza ereditaria al fruttosio	Alterazione del metabolismo del fruttosio causato da difetto dell'enzima Fruttosio Aldolasi	Esordio dei sintomi in seguito all'assunzione di fruttosio o saccarosio (frutta, alcune formule, miele e zucchero aggiunto ai cibi): vomito, ipoglicemia, torpore, epatopatia progressiva, scarsa crescita, sindrome di Fanconi renale. Rifiuto di frutta e dolci. Rapido miglioramento dopo l'eliminazione di fruttosio dalla dieta	Funzionalità epatica e renale  Sostanze riducenti nelle urine (spesso negative)	Test enzimatici (fegato) Analisi mutazionale	Dieta ad esclusione di fruttosio
Tirosinemia tipo I	Difetto della via catabolica della tirosina da difetto dell'enzima Fumarilacetoadetasi	Esordio acuto neonatale: grave insufficienza epatica, vomito, emorragie, setticemia, ipoglicemia, sindrome di Fanconi renale.  Lattante ed epoche successive: epatomegalia, cirrosi, scarsa crescita, rachitismo, ematomi, tubulopatia, segni neurologici	Funzionalità epatica e renale	Urine: aumento succinilacetone e $\delta$ -acido-aminolevulinico Aminoacidemia: aumento di tirosina	Nitisinone (1-2 mg/kg in due dosi) Dieta a ridotto apporto di fenilalanina e tirosina  Talvolta necessario trapianto epatico
Deficit di alfa-1-antitripsina	Mutazioni di alfa-1-antitripsina, il principale inibitore di proteasi del plasma.	Ittero colestatico neonatale.  Successivamente: bronchite cronica, enfisema, talvolta cirrosi epatica	Funzionalità epatica	Dosaggio alfa-1-antitripsina plasmatica	Sintomatica; prevenzione fumo attivo e passivo
M. di Wilson	Alterazione del metabolismo del rame da difetto della proteina epatica trasportatrice del rame Accumulo di rame nel fegato ed in altri organi	Esordio dopo i 6 anni: alterazioni epatiche sia acute (insufficienza epatica fulminante) che croniche (cirrosi).  Dopo i 12 anni: sintomi neurologici (segni extrapiramidali, disturbi neuropsichiatrici)	Funzionalità epatica  Visita oculistica alla ricerca dell'anello di Kaiser-Fleischer (deposito opaco corneale)	Ceruloplasmima e rame serici ( $\downarrow$ ) Rame urinario ( $\uparrow$ ) Biopsia epatica: accumulo di rame Analisi mutazionale	Dieta a basso contenuto di rame;  D-penicillamina
Glicogenosi tipo IV	Alterazione del metabolismo del glicogeno da difetto dell'enzima ramificante	Esordio nella prima infanzia: insufficienza epatica progressiva, cirrosi, ipertensione portale, crescita stentata, ipotonia muscolare.	Funzionalità epatica	Dosaggio attività enzimatica	Trapianto epatico

## D. Malattie metaboliche con principale coinvolgimento muscolare

I più frequenti sintomi di presentazione delle malattie metaboliche che colpiscono il muscolo sono rabdomiolisi acuta, crampi muscolari e debolezza, associati o meno a miocardiopatia.

Il muscolo scheletrico, nelle fasi iniziali di un intenso esercizio fisico, sfrutta il glucosio come principale fonte di energia, mentre il muscolo a riposo o il muscolo durante un esercizio prolungato utilizza gli acidi grassi liberi. Di conseguenza, i difetti che prevengono la normale produzione o il trasporto di tali fonti di energia danneggiano la funzione del muscolo scheletrico, del miocardio o di entrambi.

### *Miopatia scheletrica acuta*

I sintomi iniziali si sviluppano generalmente nell'infanzia con dolore, crampi, debolezza e mioglobinuria nelle fasi iniziali di un intenso esercizio fisico. Molto comune è il fenomeno della 'ripresa della forza', probabilmente dovuto al successivo utilizzo di acidi grassi liberi. Questi sintomi sono tipici dei difetti metabolici da alterato utilizzo di carboidrati quali le *glicogenosi*, in particolare le *glicogenosi V e VII*, ed i *difetti della glicolisi muscolare*. La diagnosi può essere sospettata con la dimostrazione che l'acido lattico sierico non aumenta durante l'esercizio (test dell'ischemia dell'avambraccio). Viceversa, i *difetti dell'ossidazione degli acidi grassi*, in particolare i difetti del trasportatore della carnitina, si manifestano in età più avanzata e nelle fasi tardive dello sforzo fisico. I sintomi più comuni sono debolezza muscolare e mioglobinuria, particolarmente se l'apporto calorico prima dell'esercizio è stato inadeguato. Oltre al digiuno, altri fattori precipitanti sono l'esposizione al freddo, infezioni e stress. In questo gruppo di disordini, i crampi muscolari sono poco comuni e il fenomeno della 'ripresa della forza' è assente. Questi disordini non hanno effetto sulla produzione di acido lattico, ma causano una riduzione dei corpi chetonici durante il digiuno prolungato. Inoltre, si può osservare un'alterazione delle carnitine e delle acilcarnitine sieriche. Per entrambi i gruppi di patologie, l'esame clinico può essere normale tra un episodio ed un altro. La diagnosi è sempre confermata da dosaggi enzimatici specifici su biopsia muscolare o fibroblasti cutanei. Il trattamento consiste nell'evitare esercizi fisici eccessivi. Per quanto riguarda i difetti di ossidazione degli acidi grassi, si consiglia di evitare digiuni prolungati e di aumentare l'apporto di carboidrati. La somministrazione di carnitina è utile nei difetti del trasportatore della carnitina.

### *Miocardiopatia*

Il muscolo cardiaco è il principale tessuto coinvolto nella *glicogenosi tipo II (m. di Pompe)*, causata dall'accumulo di glicogeno per un difetto dell'enzima alfa-glicosidasi. Nella forma classica, la cardiomiopatia ha un'esordio precoce e grave con cardiomegalia, scompenso cardiaco progressivo, ipotonia muscolare e macroglossia. I muscoli appaiono spesso ipertrofici e di consistenza gommosa. Il tracciato elettrocardiografico mostra tipicamente un intervallo PR corto, complessi QRS molto ampi ed onde T invertite. La morte sopravviene generalmente nel primo anno d'età. Le varianti giovanili ed adulte hanno un andamento lentamente progressivo e l'elemento caratterizzante è la miopatia scheletrica. Per la glicogenosi tipo II è attualmente in fase di sperimentazione una terapia enzimatica sostitutiva con enzima ricombinante.

Al di là della glicogenosi tipo II, numerose altre malattie possono presentare miocardiopatia in associazione ad altre manifestazioni cliniche. Tra queste: disordini del metabolismo degli acidi grassi, glicogenosi tipo IV, difetti della catena respiratoria mitocondriale, acidemie organiche (propionicoacidemia, metilmalonicoacidemia) ed alcune mucopolisaccaridosi.

## E. Malattie metaboliche con principale coinvolgimento renale

Un coinvolgimento renale, con compromissione della funzione glomerulare e/o tubulare, può essere presente in numerose malattie metaboliche quali le malattie mitocondriali e perossisomiali, la galattosemia, la tirosinemia, l'intolleranza al fruttosio e la malattia di Wilson, in associazione ad altri sintomi. Tuttavia, alcune patologie, come la cistinosi e la cistinuria, presentano un quadro clinico d'esordio principalmente renale.

La *cistinosi* è causata da un'anomalia della proteina di trasporto che media l'efflusso di cistina dal lisosoma. Ne consegue un accumulo di cistina in tutti i tessuti, ma il danno al tubulo renale avviene in una fase estremamente precoce della malattia, producendo così una sindrome di Fanconi renale (tubulopatia prossimale con perdita nelle urine di glucosio, fosfato, aminoacidi, proteine, bicarbonato, elettroliti ed altri soluti). L'insufficienza renale si manifesta generalmente a partire dai sei anni d'età. Altre manifestazioni cliniche, già nel primo anno di vita, sono crescita stentata, disidratazione, debolezza (conseguente a perdita di elettroliti), acidosi, rachitismo, fotofobia e retinopatia pigmentaria per deposizione di cristalli di cistina. La diagnosi è possibile grazie al dosaggio diretto della cistina nei leucociti. La terapia consiste nel trattamento degli squilibri elettrolitici e nella somministrazione di cisteamina.

La *cistinuria* è una malattia relativamente comune causata da mutazioni del suo trasportatore a livello del tubulo prossimale renale e dell'epitelio gastrointestinale. La sintomatologia è conseguente alla scarsa solubilità della cistina nelle urine che determina la formazione di calcoli renali. La diagnosi di cistinuria dovrebbe essere esclusa in tutti i pazienti con nefrolitiasi mediante il dosaggio della cistina nelle urine. Il trattamento è finalizzato a migliorare la solubilità della cistina aumentando l'apporto di liquidi e alcalinizzando le urine con bicarbonato o citrato. Per il trattamento di calcoli già esistenti, la terapia comprende l'uso di penicillamina o captopril.

## Bibliografia

CHRISTODOULOU J. Approccio clinico agli errori congeniti del metabolismo. In *Rudolph et al* (editors). *Manuale di Pediatria*, 1<sup>a</sup> Ed. italiana, McGraw-Hill, 2003

FERNANDES J et al (editors). *Inborn Metabolic Disorders: Diagnosis and Management*, 4<sup>th</sup> ed. Springer-Verlag, 2006

SCRIVER CR et al (editors). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, 2001



## Chapter 1

# Lysosomal storage disorders: commonalities and differences

Luca Astarita, Michelina Sibilio and Generoso Andria

*Department of Paediatrics, Università 'Federico II', via Sergio Pansini 5, 80131 Naples, Italy  
andria@unina.it*

### Summary

Lysosomal storage disorders, like many other groups of metabolic diseases, show a wide range of clinical phenotypes. Physical signs can be a clue to suspect and to potentially diagnose a lysosomal storage disorder, but in the early stages, signs can be mild and nonspecific and are often not easily recognized. As the disease progresses, some clinical manifestations, such as coarse facies, skeletal dysplasia, and developmental delay, can alert the physician to the possible diagnosis of a lysosomal storage disorder. Different lysosomal storage disorders share common signs and symptoms. We will consider the five main groups of these: involvement of the central nervous system (CNS), visceromegaly, a Hurler-like phenotype, haematologic findings, and the presence of a macular cherry-red spot. Various combinations of these signs can give a rather precise indication of the further diagnostic procedures that are needed to identify specific groups of lysosomal storage disorders. A high index of suspicion should be maintained so that diagnosis can be made quickly, followed by appropriate treatment. This is of great importance since innovative therapeutic approaches have been developed for some of these conditions, and these modalities are more effective if started at the earliest stages of the disease.

### General features of lysosomal storage disorders

**T**his chapter is aimed at helping physicians, particularly paediatricians, to raise their awareness of lysosomal storage disorders (LSDs) and start, as early as possible, the appropriate actions needed to take care of the patient and his or her family in the framework of a multidisciplinary team approach.

#### Genetics

LSDs are rare genetic diseases with a combined incidence of 1 in 7,000 to 10,000 live births. About 50 different LSDs are known. Almost all LSDs are transmitted in an autosomal recessive fashion, whereas only a few are inherited with an X-linked mechanism, either recessive (in Hunter disease or in Fabry disease) or dominant (in Danon disease). A positive family history can help to raise the physician's awareness of a possible genetic disorder. Autosomal recessive disorders can be suspected when two or more siblings are affected or parents are consanguineous

or when the family comes from a small isolated community, whereas in X-linked conditions only males are affected (e.g., brothers or male proband and maternal uncle) and the disease is transmitted through female carriers.

### Phenotypic variability

LSDs, like many other groups of metabolic diseases, show a wide range of clinical phenotypes, even within a single disease type or subtype. Because of the progressive nature of LSDs, in the early stage, symptoms are mild, nonspecific, and not readily recognizable.

The age of onset and the clinical course of LSDs can be variable, even amongst patients with the same enzymatic defect. Many LSDs have different forms, defined as infantile (early and late), juvenile, and adult. We also know that affected sibs who share the same genetic mutation(s) can present at different ages and have symptoms that progress at different rates (Fig. 1) (Andria *et al.*, 1979). Many LSDs, as well as other monogenic diseases, behave as multifactorial conditions, where unknown modifying genes or environmental factors influence the individual clinical presentation in spite of the identical molecular basis of the disease.



Fig. 1. Phenotypic variability in two sibs with MPS IIIB. The 13-year-old girl shown at the right displays mild coarse facies with hirsutism, prominent supraorbital ridges and thick lips, associated with severe mental retardation and visceromegaly. The 9-year-old boy at the left did not show apparent dysmorphic features of the face after many years; his mental retardation was very mild and visceromegaly absent. Even mucopolysacchariduria in this boy was intermittent and in most instances undetectable.

### From suspicion to the specific diagnosis

If there is no positive family history for LSDs, physical signs are the only way for the physician to suspect these diseases at an early stage. When an LSD is suspected, biochemical confirmation must be ascertained by testing blood, urine, or cultured fibroblasts in order to determine the specific enzyme/protein deficiency. Molecular diagnosis is now available for most LSDs to more precisely define the case.

Prenatal diagnosis (when indicated) is available for the majority of LSDs through enzymatic or molecular testing or ultrastructural examination of amniocytes and chorionic villus cells.

### From diagnosis to treatment

For the majority of LSDs there are currently no specific therapeutic approaches, and the objective thus far has been to delay or treat the clinical manifestations or complications of the disease.

However, early diagnosis of LSDs is becoming more and more important nowadays, because several innovative therapeutic approaches have become available that could be much more effective if started early.



Specific treatments for some of these diseases include:

- (1) bone marrow transplantation;
- (2) enzyme replacement therapy, with the infusion of recombinant enzyme molecules;
- (3) substrate reduction therapy, with small molecules inhibiting the synthesis of the substrate stored as a consequence of the genetic defect;
- (4) enzyme enhancement therapy, with pharmacologic chaperones.

Gene therapy is also under investigation in several LSD animal models for future transfer to human patients (Beck, 2007).

### Prognosis

Prognosis for LSDs is often unfavorable, with a progressive worsening of the clinical status, but depends on many factors, such as type of disease, age of onset, and age at start of therapy. Genotype–phenotype correlations usually are not strong, but sometimes specific mutations or types of mutations are related to disease outcome, as in the case of the N370S mutation of the  $\beta$ -glucocerebrosidase gene, which confers a mild non-neuronopathic course on patients with Gaucher disease.

## Common signs and symptoms of lysosomal storage disorders

Phenotypes of LSDs are highly heterogeneous, but it is possible to find some commonalities in the clinical expressions and presentations of some groups of LSDs.

### Age of onset

A first helpful indication comes from the age of clinical presentation. Because of the progressive nature of LSDs, a neonatal diagnosis, suspected only on clinical grounds, is uncommon. A coarse facies, generally considered a hallmark of LSDs, is only rarely present at birth (exceptions are, for example, newborns or infants with mucopolipidosis II, GM1 gangliosidosis, or infantile sialic acid storage disease) (Wraith, 2002). Only after several months do dysmorphic facial features become easily recognizable (Fig. 2). A rather pathognomonic presentation at birth in infants with various LSDs is a nonimmune hydrops foetalis, although various groups of inborn errors of metabolism other than LSDs may affect the foetus similarly, but less commonly (Table 1) (Brunetti-Pierri *et al.*, 2009).

Disorders with an early age of onset (first year of life) include Krabbe disease, Tay-Sachs disease, and Sandhoff disease (with predominant neurologic involvement), I-cell disease, sialidosis and galactosialidosis type 2, and GM1 gangliosidosis, severe infantile type (with neu-



Fig. 2. Progression of facial dysmorphism in a child with MPS IH at (left) 1 year and (right) at 6 years of age.



rologic involvement, hepatosplenomegaly, coarse facies, and joint limitations), Pompe disease (with cardiomyopathy and hypotonia), and the severe forms of Niemann-Pick disease (type A) and Gaucher disease (type 2 and 3).

Disorders with age of onset after the first year of life are mucopolysaccharidoses, mucopolipidoses, Fabry disease, Gaucher disease type 1, fucosidosis, Farber disease, and the late infantile and juvenile forms of galactosialidosis, GM2 gangliosidosis, and metachromatic leukodystrophy.

Table 1. Lysosomal disorders associated with nonimmune foetal hydrops

Disease	Defective enzyme/protein
<i>Oligosaccharidoses</i>	
GM1 gangliosidosis	$\beta$ -galactosidase
Sialidosis	Neuraminidase
Galactosialidosis	Protective protein/cathepsin A deficiency
Gaucher disease type 2	Acid $\beta$ -glucosidase
Niemann-Pick disease, type A	Sphingomyelinase deficiency
Niemann-Pick disease, type C	NPC1
Farber lipogranulomatosis	Acid ceramidase
Wolman disease	Lysosomal acid lipase
I-cell disease	Multiple defects affecting mannose-6-phosphate receptor
Infantile sialic storage disease	Sialin
Multiple sulphatase deficiency	Sulphatase-modifying factor-1
<i>Mucopolysaccharidoses</i>	
Hurler disease (MPS I)	$\alpha$ -L-iduronidase
Sly disease (MPS VII)	$\beta$ -glucuronidase
Morquio A disease (MPS IVA)	Galactosamine-6-sulphate sulphatase

### Signs and symptoms suggestive of lysosomal storage disorders

There are no signs or symptoms that are really pathognomonic of a single disease, but a physician must suspect an LSD and plan further diagnostic investigations when some 'cardinal' signs and symptoms are observed in a child. Table 2 lists selected signs and symptoms that should alert the physician and suggest an LSD (Wilcox, 2004). Only for the less frequent clinical abnormalities is the specific disease reported in parentheses. Table 3 summarizes in more detail the phenotypic variability with reference to the involvement of the main organs in selected LSDs.

Figures 2 to 4 illustrate some of the classical findings seen in LSDs that are the bases for the clinical algorithm proposed in the next section.

Generally, early presentations with life-threatening symptoms are promptly diagnosed (or suspected), but attenuated phenotypes with later onset cannot be diagnosed for many years. In these cases, anything that suggests a progressive disease, such as loss of acquired developmental skills, progressive dementia, worsening behavioural abnormalities, or signs of muscular or neurologic degeneration should be promptly recognized, because they might be the first manifestations, among other causes, of an LSD.



Table 2. Selected signs and symptoms suggestive of a lysosomal storage disorder<sup>a</sup>

<b>FACIES</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Coarse facial features</li> <li>• 'Doll-like face' (<i>GM2-gangliosidosis</i>)</li> <li>• Macroglossia</li> </ul>	<b>SKIN</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hirsutism</li> <li>• Angiokeratoma (<i>Fabry disease, fucosidosis</i>)</li> <li>• Ichthyosis, collodion baby (<i>Gaucher disease type 2</i>)</li> <li>• Subcutaneous nodules (<i>Farber disease</i>)</li> <li>• Extensive mongolian spots</li> </ul>
<b>SKELETAL</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Skeletal dysplasia, dysostosis multiplex with or without short stature</li> <li>• Joint stiffness</li> <li>• Bone crisis (<i>Gaucher disease type 1</i>)</li> </ul>	<b>BLOOD</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vacuolated lymphocytes</li> <li>• Foamy histiocytes</li> <li>• Anemia, thrombocytopenia</li> </ul>
<b>HEART</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cardiomyopathy (<i>Pompe disease, Danon disease</i>)</li> <li>• Valvular heart disease</li> </ul>	<b>EYE</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Macular cherry-red spot</li> <li>• Corneal opacities</li> <li>• Vertical supranuclear ophthalmoplegia</li> </ul>
<b>ABDOMEN</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hepatomegaly</li> <li>• Splenomegaly</li> <li>• Cholestasis (<i>Niemann-Pick disease type C, neonatal</i>)</li> <li>• Umbilical, inguinal hernias</li> </ul>	<b>CNS</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Progressive mental retardation/dementia</li> <li>• Peripheral neuropathy</li> <li>• Leukodystrophy (TC scan) (<i>Krabbe disease, metachromatic leukodystrophy</i>)</li> <li>• Seizures</li> <li>• Startling reaction (<i>GM2 gangliosidosis</i>)</li> <li>• Myoclonus</li> <li>• Ataxia</li> <li>• Hypotonia (<i>Pompe disease, Danon disease</i>)</li> <li>• Acroparesthesias (<i>Fabry disease</i>)</li> <li>• Cataplexy (<i>Niemann-Pick disease type C</i>)</li> </ul>
<b>KIDNEY</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteinuria, isosthenuria (<i>sialidosis, late infantile</i>)</li> <li>• Nonimmune hydrops foetalis, neonatal ascites (see Table 1)</li> <li>• Renal failure (<i>Fabry disease</i>)</li> </ul>	

Cataplexy: episodes of loss of muscle tone during strong emotions such as laughing or anger; angiokeratoma: raised reddish-purple vascular skin lesions.

<sup>a</sup> Examples of diseases in which signs/symptoms are less frequently found are given in italics in parentheses.

### A proposal for a clinical algorithm

Phenotypes of different LSDs usually overlap each other and it is difficult to suspect a specific disease based only on physical examination. A proposal has been made to divide signs and symptoms into five main groups according to their various associations in order to aid in clinical suspicion, even for specific groups of LSDs (Andria & Parenti, 2004).

These groups are:

- involvement of CNS and/or mental retardation;
- visceromegaly;
- 'Hurler-like' phenotype (coarse facial features and/or skeletal dysplasia);
- haematologic signs (*e.g.*, vacuolated lymphocytes, foamy histiocytes in the bone marrow) (Fecarotta & Andria, 2006);
- ocular signs (in particular macular cherry-red spot).

The observed associations of the aforementioned groups of signs and symptoms are the following:

(1) Isolated involvement of CNS in infancy represents the main clinical presentation of:

- (a) GM2 gangliosidoses (Tay-Sachs and Sandhoff disease) associated in all cases with macular cherry-red spot;

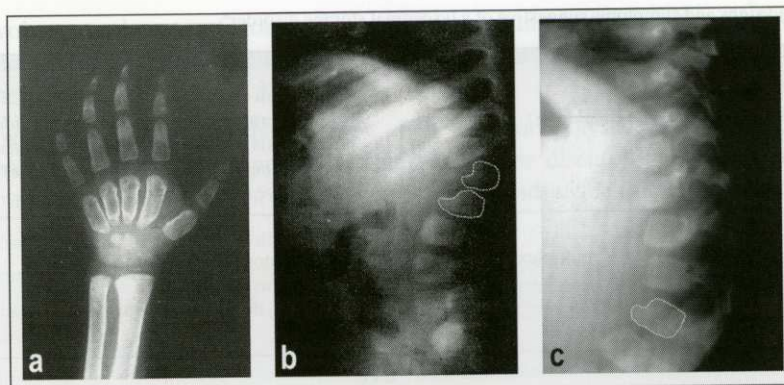


Fig. 3. Typical features of dysostosis multiplex in different examples of LSDs. X-ray of left hand and wrist (a) in a boy with the intermediate form of MPSI (formerly classified as Hurler-Scheie phenotype). Note the metacarpals with wide diaphysis and pointed distal extremities and 'bullet-shaped' phalanges. Lateral view of the spine of a child with galactosialidosis (b) and GM1 gangliosidosis (c), showing the typical deformity of lumbar vertebral bodies (hypoplasia of the anterior-superior portion) that leads in most cases to a dorsal-lumbar gibbus.

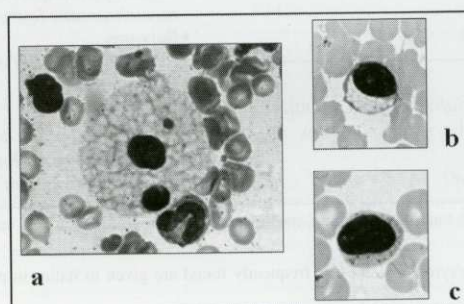


Fig. 4. Typical haematologic findings in some LSDs: (a) foamy histiocyte in the bone marrow smear of a boy with galactosialidosis; (b) lymphocyte with vacuolated cytoplasm in Niemann-Pick disease type A; and (c) metachromatic granules in the cytoplasm of a lymphocyte in the blood smear of a boy with MPS I.

(b) Schindler disease type I, Krabbe disease, and metachromatic leukodystrophy, without macular cherry-red spot.

(2) In a patient in whom mental retardation, visceromegaly and haematologic signs are associated (Fig. 5), it is crucial to evaluate the presence of a macular cherry-red spot. If it is present, a diagnosis of Niemann-Pick type A disease can be suspected; if it is absent, Gaucher disease (type 2 or 3) or Niemann-Pick disease type C (classic type) must be considered.

(3) Visceromegaly and haematologic signs, without mental retardation and skeletal dysplasia (Fig. 6), could suggest a diagnosis of Niemann-Pick type B disease (with macular cherry-red spot a rare finding) or Gaucher disease type 1 (without macular cherry-red spot).

(4) The association of all groups of signs and symptoms (Fig. 8), including the macular cherry-red spot, is suggestive of the early infantile forms of sialidosis, galactosialidosis, or GM1 gangliosidosis. Without the macular cherry-red spot, these signs are suggestive of  $\alpha$ -mannosidosis, fucosidosis, aspartyl-glucosaminuria (with only hepatomegaly), GM1 gangliosidosis, late infantile (without visceromegaly) mucopolipidosis II and III, infantile sialic acid storage disease, mucopolipidoses II and III, mucopolysaccharidoses IH, II, III, and VII, or multiple sulphatase deficiency.



Table 3. Phenotypic variability relative to main organs in selected LSDs with early onset

Disease	Facies		CNS		Eye		Liver		Spleen		Heart		Skeleton		Laboratory findings	
	Hurler-like phenotype	Mental retardation	Seizures	Myoclonus	Corneal opacities	Cherry-red spot	Hepatomegaly	Splenomegaly	Cardiomyopathy	Valvular heart disease	Short stature	Dysostosis multiplex	Haematologic signs			
<i>Mucopolysaccharidoses (specific disease)</i>																
MPS I (Hurler, Scheie)	+ → +++	- → ++	+		+		++	++	++		++	++	+			
MPS II (Hunter)	+ → +++	- → ++	+		-		++	++	++		++	++	+			
MPS III (Sanfilippo)	- → +	++	+		±		+	+	+		±	+	+			
MPS IV (Morquio)	+	-			+		+				++	+	+			
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	+ → +++	-			+		++	++	++		++	++	±			
MPS VII (Sly)	+	- → +	±		+		++	++	++		+	+	+			
Multiple sulphatase deficiency	+	++	+		±		+	+	+		+	+	+			
<i>Sphingolipidoses</i>																
Fabry disease					+						+					
Gaucher disease, neuronopathic	++	+	→ +++	+			++	++	++		++		++			
Globoid cell leukodystrophy	+	+	+	+			±	±	±			+	±			
Niemann-Pick A disease	++	+	+			+	++	++	++				++			
Niemann-Pick B disease	±					±	++	++	++				++			



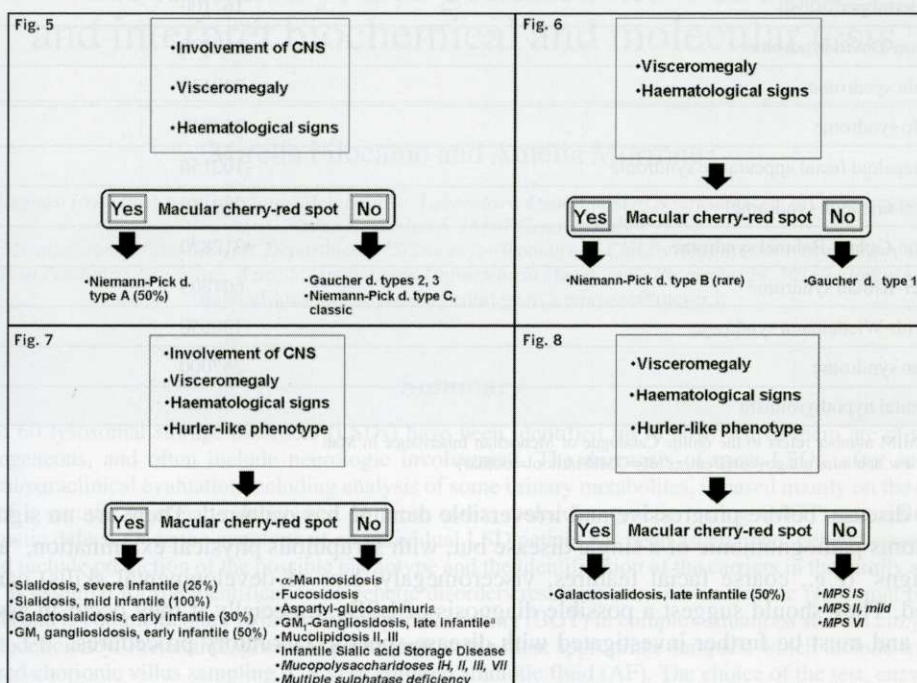
Disease	Facies		CNS		Eye		Liver	Spleen	Heart	Skeleton		Laboratory findings
	Hurler-like phenotype	Mental retardation	Seizures	Myoclonus	Corneal opacities	Cherry-red spot	Hepatomegaly	Splenomegaly	Cardiomyopathy Valvular heart disease	Short stature	Dysostosis multiplex	
Niemann-Pick C disease		++	+	+		+	+	+				++
GM1 gangliosidosis (severe infant)	+	++	+			+	+	+		+	+	+
GM2 gangliosidosis (Tay-Sachs)		++	++			+						
GM2 gangliosidosis (Sandhoff)		++	++			+	±	±				±
<i>Oligosaccharidoses</i>												
Fucosidosis	+	+	+		±		±	±		+	+	+
α-Mannosidosis	++	+			+		+	+		±	++	+
β-Mannosidosis	+	+	+							±		
Sialidosis	++	++	+	+	+	±	++	++	+	+	++	++
Schindler disease		++	+	+								
Galactosialidosis	++	±→+	±	→+	±	±	+	+	+	+	+	++
Aspartylglucosaminuria	+	+	+				±		+	±	±	+
<i>Other</i>												
Pompe disease							+		++			+
Mucopolipidosis II	++	+			+		++	±	++	++	+	+
Mucopolipidosis III	+	±	±		±		±	±	±	+	+	+

Symbols (from - to ++) indicate the degree of severity. The arrow between two symbols indicates the range of severity observed in individual patients or in different types of the same genetic disorder. A blank box means that the sign/symptom has not been reported.



(5) The absence of mental retardation, but the presence of visceromegaly, haematologic signs, Hurler-like phenotype, and macular cherry-red spot (Fig. 8) could suggest galactosialidosis (late infantile). Mucopolysaccharidoses IS or VI must be considered in the presence of associated visceromegaly, haematologic signs, and Hurler-like phenotype, without either CNS involvement or macular cherry-red spot.

Finally, there are genetic syndromes and diseases presenting with a coarseness of the face that might resemble that seen in the dysmorphic LSDs. However, these syndromes do not generally show the typical associations with dysostosis multiplex, visceromegaly, haematologic findings, or ocular features, as indicated in Figures 5-8 for LSDs. Table 4 lists such genetic syndromes and diseases with Hurler-like features of the face and the respective OMIM number for further documentation.



Figs. 5-8. Clinical approach to the diagnosis of oligosaccharidoses, mucopolysaccharidoses, sphingolipidoses, and related disorders with early (infantile) onset. The variable association of four cardinal signs or symptoms is first considered, namely: CNS involvement of various types, visceromegaly, Hurler-like phenotype, including facial dysmorphism and/or skeletal (vertebral) involvement suggestive of dysostosis multiplex, and haematologic findings in peripheral blood or bone marrow smears. The presence or absence of macular cherry-red spot is considered next, although the percentage of patients showing this spot, when described in a given disorder, is variable (as indicated in parentheses). Roman typeface shows conditions associated with abnormal oligosacchariduria whereas italics indicates conditions associated with abnormal mucopolysacchariduria.

<sup>a</sup> Absence of visceromegaly (Fig. 7).

## Conclusion

LSDs are a heterogeneous group of about 50 diseases that share a common pathogenesis. Phenotypes of LSDs show a wide spectrum of variability from the neonatal, usually severe and rapidly progressive course to a more attenuated one. Early diagnosis is crucial because new therapies are available for many LSDs that are more effective if started in the earliest stages

Table 4. Genetic syndromes and diseases presenting with coarse Hurler-like face, not associated with dysostosis multiplex, visceromegaly, haematologic findings, or ocular features typical of LSDs

Syndrome/disease	OMIM number <sup>a</sup>
Coffin-Lowry syndrome	303300
Coffin-Siris syndrome	135900
Frontometaphyseal dysplasia	305620
Sotos syndrome	117550
Williams syndrome	194050
Multiple neuroma syndrome	171400
Pachydermoperiostosis	167100
Patterson-David syndrome	169170
Fountain syndrome	229120
Costello syndrome	218040
Acromegaloid facial appearance syndrome	102150
Schinz-Giedeon syndrome	269150
Simpson-Golabi-Behmel syndrome	312870
Pallister-Killian syndrome	601803
Beckwith-Wiedemann syndrome	130650
Perlman syndrome	267000
Congenital hypothyroidism	

<sup>a</sup> The OMIM number refers to the online Catalogue of Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM&itool=toolbar>)

of the disease, before progressive and irreversible damage has occurred. There are no signs or symptoms pathognomonic of a single disease but, with scrupulous physical examination, 'atypical signs' (e.g., coarse facial features, visceromegaly, loss of developmental skills) can be noticed. They should suggest a possible diagnosis of LSDs, especially if they occur in association, and must be further investigated with disease-specific laboratory procedures.

## References

- Andria, G. & Parenti, G. (2004): Oligosaccharidoses and related disorders. In: *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases* (2<sup>nd</sup> ed.), eds. N. Blau, M. Duran, M.E. Blaskovics & K.M. Gibson, pp. 399–410. Heidelberg: Springer Verlag.
- Andria, G., Di Natale, P., Del Giudice, E., Strisciuglio, P. & Murino, P. (1979): Sanfilippo B syndrome (MPS III B): mild and severe forms within the same sibship. *Clin. Genet.* **15**, 500–504.
- Beck, M. (2007): New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy. *Hum. Genet.* **121**, 1–22.
- Brunetti-Pierri, N., Parenti, G. & Andria, G. (2010): Inborn errors of metabolism. In: *Neonatology, a practical approach to neonatal diseases*, eds. G. Buonocore, R. Bracci & M. Weindling. Heidelberg: Springer Verlag. In press.
- Fecarotta, S. & Andria, G. (2006): Hematological manifestations in inborn errors of metabolism. *Ital. J. Pediatr.* **32**, 241–250.
- Wilcox, W.R. (2004): Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J. Pediatr.* **144** (Suppl.), S3–14.
- Wraith, J.E. (2002): Lysosomal disorders. *Semin. Neonatol.* **7**, 75–83.